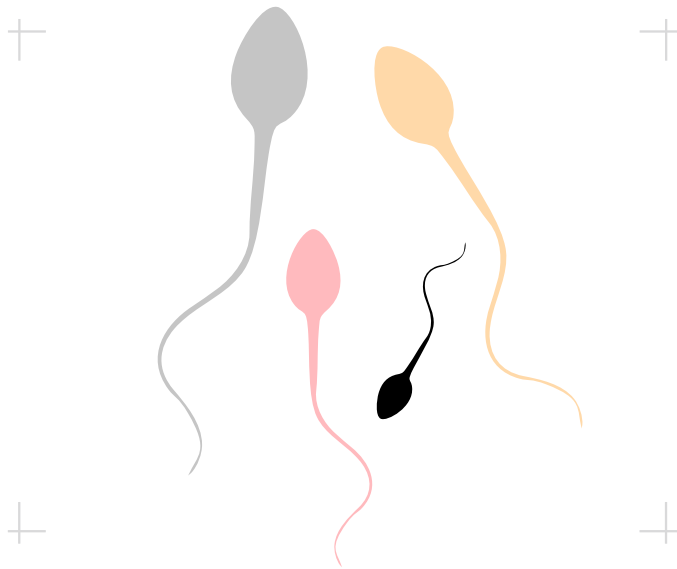


METHODISCHE UNTERSUCHUNG ZUR FÄRBUNG VON FLÜSSIGKONSERVIERTEM EBERSPERMA

Annika Schneider



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2014

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin, Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und
Andrologie der Groß- und Kleintiere mit tierärztlicher Ambulanz
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. A. Wehrend

**METHODISCHE UNTERSUCHUNG ZUR FÄRBUNG VON
FLÜSSIGKONSERVIERTEM EBERSPERMA**

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Annika Schneider

Tierärztin aus Köln

Gießen (2014)

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. A. Wehrend
Prof. Dr. Dr. habil. G. Reiner

Prüfer Prof. Dr. G. Erhardt

Tag der Disputation: 18.07.2014

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 2 | Literatur | 2 |
| 2.1 | Anwendung von unterschiedlichen Färbemethoden zur Untersuchung von porcinen Samenzellen | 2 |
| 2.1.1 | Eosin | 2 |
| 2.1.2 | Eosin-Nigrosin | 4 |
| 2.1.3 | Diff-Quick® | 6 |
| 2.1.4 | Hemacolor® | 7 |
| 2.1.5 | Sangodiff G® | 8 |
| 2.1.6 | Spermac® | 9 |
| 2.1.7 | Formolcitrat-Bengalrosa | 10 |
| 2.1.8 | Testsimplets® | 11 |
| 2.1.9 | Methyl-Violett | 13 |
| 2.1.10 | Weitere Färbemethoden bei porcinen Samenzellen | 13 |
| 3 | Material und Methoden | 16 |
| 3.1 | Probenauswahl | 17 |
| 3.2 | Vorbereitung und Untersuchung der Proben | 17 |
| 3.2.1 | Lagerung bei 18° C | 17 |
| 3.2.2 | Lagerung im Wasserbad bei 38° C | 17 |
| 3.2.3 | Lagerung im Kühlschrank bei 6° C | 17 |
| 3.3 | Ausstriche | 17 |
| 3.4 | Färbemethoden | 18 |
| 3.4.1 | Eosin | 18 |
| 3.4.2 | Eosin-Nigrosin | 19 |
| 3.4.3 | Diff-Quick® | 20 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.4.4 | Hemacolor® | 21 |
| 3.4.5 | Sangodiff-G® | 22 |
| 3.4.6 | Spermac® | 23 |
| 3.4.7 | Formolcitrat-Bengalrosa..... | 25 |
| 3.4.8 | Testsimplets® | 26 |
| 3.4.9 | Methyl-Violett | 27 |
| 3.5 | Beurteilungskriterien..... | 28 |
| 3.6 | Lagerung | 31 |
| 3.7 | Wiederholungsuntersuchung..... | 31 |
| 3.8 | Finanzieller und zeitlicher Aufwand | 31 |
| 3.9 | Reproduzierbarkeit der Untersuchungsergebnisse bei unterschiedlichen Untersuchungstechniken und Untersuchern..... | 31 |
| 3.10 | Statistische Auswertung | 32 |
| 4 | Ergebnisse | 34 |
| 4.1 | Vergleich des zeitlichen Aufwandes | 34 |
| 4.2 | Vergleich des finanziellen Aufwandes | 36 |
| 4.3 | Auswertung der einzelnen Färbemethoden..... | 39 |
| 4.3.1 | Eosin..... | 43 |
| 4.3.2 | Eosin-Nigrosin..... | 45 |
| 4.3.3 | Diff-Quick®..... | 46 |
| 4.3.4 | Hemacolor®..... | 47 |
| 4.3.5 | Sangodiff-G® | 48 |
| 4.3.6 | Spermac® | 50 |
| 4.3.7 | Formolcitrat-Begalrosa..... | 51 |
| 4.3.8 | Testsimplets® | 53 |
| 4.3.9 | Methyl-Violett | 55 |
| 4.4 | Vergleich der Lebend-Tot-Beurteilung..... | 57 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|------------|
| 4.5 | Einfluss der Art der Lagerung des Spermas vor der Färbung auf die Auswertung..... | 59 |
| 4.6 | Lagerfähigkeit der gefärbten Objektträger | 75 |
| 4.7 | Reproduzierbarkeit der Untersuchungsergebnisse bei unterschiedlichen Untersuchungstechniken und Untersuchern..... | 89 |
| 5 | Diskussion..... | 99 |
| 5.1 | Diskussion der Fragestellung | 99 |
| 5.2 | Diskussion der Methodik | 100 |
| 5.3 | Diskussion der Ergebnisse | 106 |
| 5.3.1 | Vergleich des zeitlichen Aufwandes..... | 106 |
| 5.3.2 | Vergleich des finanziellen Aufwandes..... | 107 |
| 5.3.3 | Auswertung der einzelnen Färbemethoden | 108 |
| 5.3.4 | Vergleich der Lebend-Tot-Beurteilung | 115 |
| 5.3.5 | Einfluss der Art der Lagerung des Spermas vor der Färbung auf die Auswertung | 117 |
| 5.3.6 | Lagerfähigkeit der gefärbten Objektträger..... | 119 |
| 5.3.7 | Reproduzierbarkeit der Untersuchungsergebnisse bei unterschiedlichen Untersuchungstechniken und Untersuchern..... | 121 |
| 5.4 | Schlussbetrachtung und Fazit für die Praxis..... | 122 |
| 6 | Zusammenfassung | 125 |
| 7 | Summary | 132 |
| 8 | Anhang | 139 |
| 9 | Literaturverzeichnis..... | 145 |

Abkürzungsverzeichnis

| | | | |
|------------|-----------------|----------------------|------------------|
| ad. | addiere | MV | Methyl-Violett |
| aqua dest. | Aqua destillata | p | Signifikanzwert |
| ASMA | Automatisiertes | R | Spannweite |
| | Samenzell- | S | Spermac |
| | Analyse-System | SCA | Sperm Class |
| BTS | Beltsville | | Analyzer |
| | Thawing | SD | Sangodiff-G® |
| | Solution | Sek. | Sekunden |
| ca. | circa | TS | Testsimplets® |
| cm | Zentimeter | WB | Wasserbad |
| ° C | Grad Celsius | WHO | World Health |
| DQ | Diff-Quick® | | Organisation |
| E | Eosin | ZP | Zeitpunkt |
| EN | Eosin-Nigrosin | ZT | Zimmer- |
| et al. | et alii | | temperatur |
| FB | Formolcitrat- | | |
| | Bengalrosa | | |
| g | Gramm | Sonderzeichen | |
| H | Hemacolor® | | |
| Hrsg. | Herausgeber | % | Prozent |
| h | Stunden | ± | Plusminus |
| KS | Kühlschrank | ® | Warenzeichen |
| Min. | Minuten | Ø | durchschnittlich |
| ml | Milliliter | \bar{x} | Arithmetischer |
| mm | Millimeter | | Mittelwert |
| µl | Mikroliter | ° | Grad |

1 Einleitung

Die Färbung von Samenzellen spielt eine große Rolle im Rahmen der spermatologischen Untersuchung.

Mittlerweile existiert in der Literatur eine Vielzahl von Färbemethoden, die sich hinsichtlich der Darstellung verschiedener Strukturen der Samenzelle und ihrem Einsatz bei den unterschiedlichen Tierarten unterscheiden. Ziel der Untersuchung im Rahmen dieser Doktorarbeit ist es folgende Fragestellungen zu beantworten:

- Welche Färbemethoden für die lichtmikroskopische Untersuchung eignen sich am besten für flüssigkonservierte porcine Samenzellen?
- Wie unterscheiden sich die verschiedenen Färbemethoden für porcine Spermien hinsichtlich ihres finanziellen und zeitlichen Aufwandes?
- Welche Unterschiede gibt es zwischen den Färbemethoden bezüglich ihrer Lagerungsfähigkeit nach der Anfertigung und der ersten Beurteilung?
- Sind die Untersuchungsergebnisse der gefärbten Ausstriche abhängig vom Untersucher und der Art der Durchmusterung des gefärbten Präparates?

2 Literatur

2.1 Anwendung von unterschiedlichen Färbemethoden zur Untersuchung von porcinen Samenzellen

2.1.1 Eosin

Die Eosin-Färbung ist eine Methode zur Untersuchung einer Samenportion auf die Vitalität der darin enthaltenen Samenzellen, basierend auf der variierenden Durchlässigkeit der Plasmamembran von lebenden und toten Spermien für den Farbstoff Eosin. Er wird von lebenden Zellen ausgeschlossen und kann nur in tote Zellen mit defekter Plasmamembran eindringen. Zusätzlich kann an einem mit Eosin gefärbten Präparat auch die Untersuchung der Pathomorphologie der einzelnen Samenzellen durchgeführt werden.

Erste dokumentierte Anwendungen von Eosin-Färbungen an tierischen Samenzellen erfolgten durch Lasley et al. (1942) mit der Färbung von Schafsbocksperma mit Eosin und Opalblau. Im 2. Weltkrieg war die hier benutzte Hintergrundfarbe Opalblau nicht verfügbar und es wurde Fast Green verwendet, um die Unterschiede zwischen mit Eosin gefärbten und nicht gefärbten Samenzellen vor dem jeweiligen Hintergrund deutlicher herauszustellen. Im Rahmen dieser Untersuchung wurde neben Hengst-, Schafbock-, Kaninchen-, Bullen- und menschlichen Samen auch die Anwendbarkeit der Kombination von Eosin und Fast Green bei porcinen Samenzellen getestet. Die Färbelösung wurde hergestellt, in dem 2 g Fast Green mit 0,8 g Eosin B und 100 ml Phosphatpuffer gemischt wurden. Dann erfolgte das Auftragen von einem Tropfen Färbelösung an einem Ende des Objektträgers. Danach wurde ein Glasrührstäbchen mit dem aufgemischten Ebersperma benetzt und sofort mit der Färbelösung auf dem Objektträger gemischt. Um den Ausstrich anzufertigen, wurde ein zweiter Objektträger auf den Ersten gelegt und die beiden entgegengesetzt auseinander gezogen und unverzüglich unter einem Föhn getrocknet. Zusätzlich wurde im Rahmen dieser Auswertungen beobachtet, dass neben Eosin B, auch Eosin Y, Rose Bengal und Erythrocin für die Vitalitätsfärbung geeignet sind. Allerdings konnten speziell bei den Untersuchungen mit Ebersperma keine mit den anderen untersuchten Spezies vergleichbaren Ergebnisse mit dieser Lebend-Tot-Färbung erzielt

werden. Es wurde vermutet, dass beim Eber Bestandteile des Seminalplasma für die Beeinträchtigung verantwortlich sind (Mayer et al., 1951).

Daneben gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten eine Färbung mit Eosin alleine anzufertigen. Die in Lehrbüchern gängige Methode ist der Ausstrich mit Eosin. Es wird eine 2%ige Farbstofflösung aus 2 g Eosin B und 3 g Natriumcitrat ad 100 ml Aqua dest. hergestellt und 2 Tropfen auf einen entfetteten, sauberen, vorgewärmten Objektträger aufgetragen. Direkt daneben wird 1 Tropfen Sperma aufgebracht und durch vorsichtiges Kippen miteinander vermischt. Dann wird ein Tropfen des Gemisches auf einem zweiten vorgewärmten und entfetteten Objektträger nach Art des Blutausstriches ausgestrichen und auf einem Heiztisch getrocknet (Weitze, 2001; Busch und Waberski, 2007; Hoffmann, 2003).

Eine weitere Möglichkeit Sperma mit Eosin anzufärben besteht in der Herstellung eines Feuchtpräparates. Dafür erfolgt das Auftragen der Färbelösung auf einen entsprechend vorbereiteten Objektträger in doppelt so großer Menge wie die des Spermas. Dann wird das Gemisch mit einem Deckglas abgedeckt (Schirren et al., 1958). Diese Technik der Herstellung eines Feuchtpräparates wird bis heute verwendet. Im Standardwerk der humanen spermatologischen Untersuchung wird zur Herstellung der Eosinlösung 0,9%ige Natriumchloridlösung mit 0,5%igem Eosin Y vermischt und in gleichen Teilen mit aufgeschütteltem Sperma auf einem Objektträger zusammengeführt. Die Abdeckung erfolgt mit einem Deckglas und das so hergestellte Präparat kann nach 30 Sekunden untersucht werden (WHO manual for the examination and processing of human semen, 2010).

Bei der Gegenüberstellung verschiedener Supravitalfärbemethoden bei Eber und Bulle, wurde Eosin bei dem Vergleich der Anzahl der als vital bzw. nicht vital gekennzeichneten Samenzellen ähnlich wie der Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 und die Eosin-Nigrosin-Färbung bewertet. Ein weiterer fluoreszierender Farbstoff, Propidiumiodide, detektierte eine signifikant höhere Anzahl nicht vitaler Samenzellen (Pintado et al., 2000).

Bei dem Versuch ein Standardprotokoll zur Beurteilung von porcinen Samenzellen mit dem Automatisierten Samenzell-Analyse-System, Hobson Morphology Package, zu erstellen, stellte sich heraus, dass bei der Färbung mit Eosin und Hämatoxylin ein ausreichend guter Kontrast erreicht wurde, um eine

zuverlässige Aussage zu treffen. Im Gegensatz dazu sind die Färbungen Diff-Quick und Papanicolaou zur Zusammenarbeit mit dem Automatisierten Samenzell-Analyse-System, Hobson Morphology Package, beim Eber nicht geeignet (Thurston et al., 1999).

2.1.2 Eosin-Nigrosin

Die Eosin-Nigrosin-Färbung dient wie die Eosin-Färbung der Beurteilung der Vitalität und gleichzeitig der Untersuchung der Pathomorphologie von Samenzellen. Bei dieser Kombination von Farbstoffen färbt Nigrosin den Hintergrund, um den Unterschied zwischen ungefärbten und gefärbten Spermienköpfen klarer hervorzuheben.

Die erste Anwendung von Eosin-Nigrosin an tierischen Samenzellen fand an bovinen Spermatozoen statt. Sie wurden zuerst mit Eosin-Opalblau, einem blauen Eosin-Farbstoff, gefärbt und dann Nigrosin ausgesetzt. Zur Herstellung der Eosin-Färbung wurden 50 g/l Eosin Opalblau mit Aqua dest. gemischt. Anschließend wurde ein Teil Samen mit zwei Teilen Färbelösung versetzt. Daraufhin wurden vier Teile Nigrosinlösung, hergestellt aus 100 g/l Nigrosin in Aqua dest., hinzugefügt und nach ein paar Sekunden ausgestrichen. Der gesamte Vorgang soll nicht länger als eine Minute andauern (Blom, 1951).

Hancock studierte mit Hilfe der Eosin-Nigrosin-Färbung zum ersten Mal die Morphologie von porcinen frisch ejakulierten Samenzellen. Vorangehende Untersuchungen an Ebersamen und die daraus resultierenden Beschreibungen der morphologischen Beschaffenheit der einzelnen porcinen Samenzelle basierten immer auf Material aus bereits verstorbenen Ebern (Retzius, 1909). Er benutzte eine neue Zusammenstellung des Färbemittels (Hancock, 1953). Es wurden 20 g Nigrosin in 100 ml Aqua dest. zum Kochen gebracht und mit 5 g Eosin Y vermischt. Dann wurden 30 ml Glucoselösung und 30 ml Pufferlösung hinzugefügt, die isotonisch mit Eber und Bullensperma ist, und mit Wasser auf 300 ml aufgefüllt.

Desweiteren wurde die Eosin-Nigrosin-Färbung beim Eber zur Untersuchung der Lagerfähigkeit von Spermien nach Vorfixierung mit Formolcitrat angewendet. Die hier benutzte Rezeptur wurde von Dott und Foster (1972) beschrieben und setzt sich aus 0,67 g Eosin Y, 0,9 g Natriumchlorid und 10 g

Nigrosin auf 100 ml Aqua dest. zusammen. Sie wird ebenso zum Kochen gebracht und kann nach dem Abkühlen verwendet werden. Es werden ein Tropfen Samen mit 8 Tropfen Färbelösung vermischt und auf vorgeheizten Objektträgern ausgestrichen. Bei der Untersuchung stellte sich heraus, dass bei Ebersamen im Gegensatz zu Schafsbock- und Kaninchensamen nach 48 Stunden Lagerung bei unterschiedlichen Temperaturen (4°C, Raumtemperatur, 40°C) keine relevanten Unterschiede in der Vitalität bei Verwendung der Eosin-Nigrosin-Färbung zu finden sind (Dott und Foster, 1975).

Weitere Verwendung fand die Eosin-Nigrosin-Färbung beim Eber zur Untersuchung der Akrosombeschaffenheit unter dem Lichtmikroskop als wichtiger Indikator für die Befruchtungsfähigkeit einer Samenportion (Bamba, 1988).

Die deutliche Darstellung des Akrosom mittels Eosin-Nigrosin-Färbung wird von Tamuli und Watson (1994) in Frage gestellt. Sie präsentieren mit Eosin-Nigrosin in Kombination mit Giemsa eine Färbemethode, die sich sowohl zur Beurteilung der Vitalität als auch der Akrosombeschaffenheit eignet und ebenso mit einem Lichtmikroskop auswertbar ist. Bei einer alleinigen Färbung mit Eosin-Nigrosin stellt sich das lebende Spermium ungefärbt und das tote Spermium matt pink mit einem schlecht abgrenzbaren Rand dar. Im Unterschied dazu färbt sich bei der Eosin-Nigrosin-Giemsa-Kombination die postakrosomale Region bei der lebenden Samenzelle pink und bei der toten Samenzelle dunkel lila an, sodass sich das Akrosom und seine Beschaffenheit gut von dem dunkel angefärbten postakrosomalen Bereich abhebt. Bei einem Versuch zur alleinigen Beurteilung der Erkennbarkeit der Vitalität mit den beiden zum Vergleich stehenden Färbungen, schnitten beide gleich gut ab. Mit der Eosin-Nigrosin-Giemsa-Färbung kann zwischen vier unterschiedlichen Gruppen unterschieden werden: Lebend mit intaktem Akrosom, Lebend mit beschädigtem Akrosom, Tot mit intaktem Akrosom und Tot mit beschädigtem Akrosom (Tamuli und Watson, 1994).

In einer Studie zur Untersuchung des Zusammenhanges zwischen der Morphologie der Samenzellen und des tatsächlichen Befruchtungserfolges, wurde die Eosin-Nigrosin-Färbung verwendet. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass die Abferkelrate sich entsprechend der Morphologie der

Samenzellen verändert, die Wurfgröße allerdings nicht, obwohl sie eigentlich als der sensitivere Indikator gilt (Tsakmakidis et al., 2010).

Die Färbung von porcinen Samenzellen mit Eosin-Nigrosin wurde in den Studien von Rodriguez et al. (2012, 2013) zur Bestimmung der Vitalität neben der Konzentration und Motilität als ein Parameter für die Samenqualität verwendet.

Im humanen Bereich wird neben der Eosin-Färbung auch die Eosin-Nigrosin-Färbung beschrieben. Die Zusammensetzung des Färbemittels gleicht der von Dott und Foster (1972) verwendeten Rezeptur, allerdings wurden hier Samen und Färbemittel zu gleichen Anteilen und nicht im Verhältnis 1 : 8 vermischt (World Health Organisation, 2010).

2.1.3 Diff-Quick®

Bei der Diff-Quick®-Färbung handelt es sich um eine Schnellfärbemethode, bestehend aus einer Fixierlösung, einer basophilen und einer eosinophilen Färbelösung.

Sie wurde von Kruger et al. (1987) bei humanen Spermatozoen eingeführt. Beim Vergleich mit der damaligen Standardfärbung Papanicolaou stellt sich heraus, dass keine entscheidenden Unterschiede zwischen der Auswertung von mit Diff-Quick® gefärbten Samenausstrichen und mit Papanicolaou gefärbten Samenausstrichen vorhanden sind. Es sollten keine zu dicken Ausstriche angefertigt werden, damit sich der Hintergrund der mit Diff-Quick® gefärbten Ausstriche nicht anfärbt. Ansonsten ist die Diff-Quick®-Färbung gegenüber der Papanicolaou-Färbung zu bevorzugen, weil sie schneller, einfacher und durch kommerzielle Herstellung standardisiert durchführbar ist (Kruger et al., 1987).

Diese Schnellfärbemethode wurde mehrfach im Zusammenhang mit Automatisierten-Samenzell-Analyse-Systemen angewendet, die dazu dienen, die Beurteilung der Pathomorphologie von Samenzellproben objektiver und sensitiver zu gestalten. Diese Untersuchungen mit tierischen Samenzellen wurden mit Affensperma (*Macaca fascicularis*) durchgeführt. Es erfolgte ein Vergleich zwischen den Färbemethoden Hämatoxylin, Diff-Quick® und Hemacolor® bezüglich ihrer Eignung zur Verwendung mit dem ASMA, Sperm

Class Analyzer (SCA) von Microptic. Hämatoxylin erzielt den höchsten Anteil, Diff-Quick® einen Mittleren und Hemacolor® den niedrigsten Anteil korrekt erfasster Spermienköpfe. Zusätzlich färbt sich das Seminalplasma im Hintergrund der Samenzellen stark an und es lagern sich viele dem Färbemittel zugeordnete Partikel an die Spermienköpfe, was die Auswertung deutlich erschwert (Gago et al., 1998).

In einer weiteren Studie zur computergestützten Spermienanalyse, in diesem Fall bei Samenproben vom Rotwildhirsch, wurde allerdings betont, dass bei der Färbung mit Diff-Quick® mehr Spermien automatisch erkannt wurden als bei der Verwendung von Hämatoxylin oder Hemacolor®. Hinzu kommt, dass Diff-Quick® am besten geeignet ist, die Spermien der einzelnen Rotwildhirsche zu unterscheiden (Soler et al., 2005).

Die Anwendung der Diff-Quick®-Färbung bei Samenzellen des Ebers ist noch nicht dokumentiert.

2.1.4 Hemacolor®

Die Hemacolor®- Färbung, ebenfalls eine Schnellfärbemethode, besteht aus drei verschiedenen Lösungen.

Die erste Lösung ist Methanol zur Fixierung der Spermien auf dem Objektträger. Die zweite Lösung ist eine rote Färbelösung und enthält Eosin G, um eine Rotfärbung der basischen Bestandteile der Samenzelle mit der sauren Färbelösung zu erreichen. In der dritten blauen Färbelösung ist Azur B und Methylenblau enthalten, um die sauren Zellbestandteile mit der basischen Färbelösung blau anzufärben. Das Prinzip der Färbungen basiert auf einer Wechselwirkung der Desoxyribonucleinsäure im Zellkern der Samenzelle mit den Farbreagenzien, welche zur Färbung des Zellkernes führt.

Hemacolor® wurde ebenso wie Diff-Quik® im Zusammenhang mit einem Automatisierten Samenzell-Analyse-System, dem Sperm Class Analyzer, beim Affen (*Macaca fascicularis*) getestet. Die Studien kommen zu dem Ergebnis, dass Hemacolor® nur einen geringen Kontrast der Spermien zum Hintergrund herstellt, weil die Spermienköpfe nur schwach angefärbt werden. Im Gegensatz dazu ist die Färbung der Köpfe bei einer Hämatoxylin-Färbung intensiver und

somit ist diese Färbung für die Verwendung zusammen mit dem ASMA und Affensperma besser geeignet (Gago et al., 1998).

In der ersten Studie zur Untersuchung von Eberspermien mit einem Automatisierten Samenzell-Analyse-System, dem Integrated Semen Analysis System Proiser R+D, wurde ebenfalls mit Hemacolor® gefärbt und dann mit der Schnellfärbemethode Panoptic und Harris` Hämatoxylin verglichen. Harris` Hämatoxylin lieferte keine auswertbaren Ergebnisse im Bereich der Darstellbarkeit des Mittelstückes, was bereits bei Spermien von Rotwild durch Soler et al. (2005) berichtet wurde. Die Färbung mit Panoptic in Zusammenarbeit mit dem AMSA rief den größten Anteil an nicht korrekt erkannten Kopfveränderungen hervor. Hemacolor® hingegen färbte die Spermien zufriedenstellend an, schuf einen guten Kontrast zum Hintergrund und wurde als die beste Färbemethode zur Untersuchung von Eberspermien mit dem ASMA dargestellt (Garcia-Herreros et al., 2006).

Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse wurde eine weitere Studie zur Untersuchung von mit Hemacolor® gefärbten Ebersamen mittels ASMA durchgeführt. Hier wurden die Auswirkungen von Kältekonservierung auf die morphologische Beschaffenheit der Samenzellen beim Eber untersucht. Es zeigte sich bei allen Ebern eine signifikante Verkleinerung des Kopfes und des Mittelstückes (Garcia-Herreros et al., 2007).

2.1.5 Sangodiff G®

Sangodiff-G® ist eine transparente Folie, die mit einem Farbstoff beschichtet ist, dessen Färbemuster dem einer klassischen Giemsa-Färbung entspricht.

Die Färbefolie wird auf einen luftgetrockneten Ausstrich, der mit Fixierlösung bedeckt ist, aufgebracht. Das dadurch entstandene Präparat ist im Gegensatz zu Testsimplets®, die ohne Fixiermittel angefertigt werden, dauerhaft haltbar. Allerdings können durch den Gebrauch der Fixierlösung Artefakte entstehen (Wernicke und Schirren, 1982).

Die oben beschriebene Anwendung fand an humanem Ejakulat statt und es sind bisher keine dokumentierten Anwendungen bei tierischen, speziell porcinen Samenzellen bekannt.

2.1.6 Spermac®

Spermac® ist eine dichromatische Färbemethode, die hauptsächlich zur lichtmikroskopischen Beurteilung der Akrosomintegrität angewendet wird.

Sie wurde erstmalig bei humanen und caninen Spermatozoen im Zusammenhang mit Untersuchungen zur Tiefgefriereignung vorgestellt (Oettlé, 1986a; Oettlé, 1986b). Der Autor stellte die Spermac®-Färbung im Zusammenhang mit der Beweglichkeit und Vitalität einer Samenprobe als zuverlässigen Parameter zur Überprüfung der Samenqualität und somit der Befruchtungsfähigkeit eines zuvor tiefgefrorenen Ejakulates dar. Zusätzlich wird Spermac® als schnelle und zuverlässige Methode zur Beurteilung von sowohl verdünntem als auch gefrorenem Samen beschrieben, weil der Hintergrund des Ausstriches sich bei dieser Färbemethode nicht anfärbt (Oettlé und Soley, 1986). Grundsätzlich färbt Spermac® den Zellkern und die postakrosomale Region rot und das Akrosom, das Mittelstück und den Schwanz grün.

Daraus ergibt sich eine Unterteilung in vier verschiedene Zustände:

- Typ 1: Das normale, intakte Akrosom stellte sich gleichmäßig, dunkelgrün gefärbt dar und hat einen glatten Rand.
- Typ 2: Der Verlust von akrosomaler Substanz ohne schwere Membranschäden färbt das Akrosom hellgrün und zeigt ebenso wie Typ 1 einen glatten Rand.
- Typ 3: Schwere Akrosomschäden zeigen sich an einem geschwollenen, unregelmäßigen Rand und einer lediglich blassen Anfärbung des Akrosomes.
- Typ 4: Ein komplettes Fehlen der akrosomalen Membran präsentiert sich entsprechend der grundsätzlichen Färbemethodik der Spermac®-Färbung mit einer roten Färbung des Kopfbereiches (Oettlé und Soley 1986).

Bei der Anwendung der Spermac®-Färbung bei der Katze fiel auf, dass im Gegensatz zur Hancock-Färbung signifikant weniger Plasmotropfen zu sehen sind. Es wird deutlich darauf hingewiesen, dass die Spermac®-Färbung zur Beurteilung der Akrosomintegrität, in diesem speziellen Fall nach dem Auftauen, sehr gut geeignet ist und nicht zur Untersuchung von Plasmotropfen verwendet werden sollte (Schäfer und Holzmann, 2000).

Die Spermac®-Färbung wurde bei Eberspermien ebenfalls zur Überprüfung von Akrosomintegritätsveränderungen während des Tiefgefriervorganges angewendet. Hier erfolgte der Vergleich mit anderen Arbeitstechniken, die dazu dienen, den akrosomalen Status bei porcinen Samenzellen zu überprüfen. Häufig werden fluoreszierende Färbemethoden verwendet, deren Anfertigung allerdings sehr zeitaufwendig ist und gleichzeitig einer besonderen Ausstattung, wie zum Beispiel einem Phasenkontrast-Mikroskop oder Fluoreszenzmikroskop, bedarf. Spermac® ist sehr gut geeignet, um die Akrosomintegrität bei Eberspermien zu bestimmen. Die Qualität und Deutlichkeit der Färbung bei Spermien, die nicht dem Kühl- oder Gefrierprozess ausgesetzt waren, ist jedoch eindeutig besser. Es wird vermutet, dass es durch das Herunterkühlen bzw. Tiefgefrieren zu einem Verlust von anfärbbarem Material kommt, was wiederum auf einen akrosomalen Schaden schließen lässt. Zusätzlich ist die Qualität jener Ausstriche herabgesetzt, die aus Sperma hergestellt worden sind, das mit Eidotter behandelt war. Der Verlust der Beweglichkeit und der Akrosomintegrität bestätigt auch die Ergebnisse anderer Studien, dass es speziell beim Eber zur deutlichen Qualitätsminderung des Samens nach Kältekonservierung kommt (Paulenz et al., 1995).

2.1.7 Formolcitrat-Bengalrosa

Die Formolcitrat-Bengalrosa-Färbung ist eine Färbemethode, die sich besonders zur Beurteilung des Akrosoms eignet.

Das in dieser Färbung verwendete Bengalrosa wird erstmalig von Talbot und Chacon (1981) als eines der Färbemittel in der sogenannten „triple-stain method“ zur Beurteilung von humanen Spermatozoen angewendet. Zur Unterscheidung der vitalen und nicht vitalen Spermien wird mit Trypanblau gefärbt. Bismarkbraun ist verantwortlich für die hellbraune Färbung der postakrosomalen Region und Bengalrosa färbt das Akrosom pink an.

Nach Riesenbeck et al. wurde 2001 die Fixierlösung aus 2,9 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat, 4 ml 35% Formaldehydlösung, 0,156 g Rose Bengal und 100 ml Aqua destillata hergestellt. Zur Durchführung der Formolcitrat-Bengalrosa-Färbung wurde 300 µl Fixierlösung mit 10 µl Sperma in einem Gefäß gründlich vermischt und dann 10 µl der Suspension für ein Deckglaspräparat verwendet.

Die Färbung mit Bengalrosa wird in wissenschaftlichen Studien hauptsächlich zur Untersuchung des akrosomalen Status von Spermien beispielsweise beim Mensch, Bullen, Ziegenbock, Elefanten und Hirsch verwendet (Nandi et al., 2012; Kitiyanant et al., 2000; Glazier et al., 2000; Gravance et al., 1998; Garde et al., 1997)

Beim Eber gibt es eine vergleichende Studie zur Beurteilung der Pathomorphologie von porcinen Samen mit Formaldehyd und Bengalrosa. Gegenübergestellt werden die Fixierung mit Formaldehyd-Citrat, betrachtet im Phasenkontrast-Mikroskop, und der Färbung mit Bengalrosa und Beurteilung mit einem Lichtmikroskop. Der einzige relevante Unterschied bei der Auswertung der beschriebenen Methoden ist eine erhöhte Anzahl an Schwanzdefekten bei der Färbung mit Bengalrosa, vermutlich zurückzuführen auf die Ausstrichtechnik, die zu einer vermehrten Anzahl an Schwanzbrüchen führt. Kopf-, Akrosom-, Mittelstückveränderungen und die Gesamtzahl der pathomorphologischen Veränderungen stellte sich in den beiden Methoden gleich dar (Oberlender et al., 2012).

2.1.8 Testsimplets®

Bei Testsimplets® handelt es sich um farbstoffbeschichtete Objektträger, auf die ein Tropfen Sperma aufgebracht und mit einem Deckglas bedeckt wird. Laut Hersteller handelt es sich um eine Folie auf die zwei verschiedene Färbemittel, Cresylviolett Acetat und Methylenblau, gleichmäßig und standardisiert aufgetragen sind.

Diese Methode wurde erstmalig für die Untersuchung von humanen Spermatozoen beschrieben (Schirren et al., 1977) und von Schirren et al. (1982) später mit Sangodiff G, einer oben bereits genannten industriell vorgefertigten Färbemethode, verglichen. Sowohl der farbstoffbeschichtete Objektträger der Testsimplets®, als auch die farbstoffbeschichtete Färbefolie Sangodiff G, eignen sich für die morphologische Differenzierung menschlicher Samenzellen. Testsimplets® sind sehr einfach anzuwenden und eignen sich für die praktische Anwendung, aber sie verfügen nicht über eine längere Lagerfähigkeit. So lassen sie sich bei Zimmertemperatur nur für 2 - 4 Stunden und bei -18°C für 40 Stunden lagern (Wernicke und Schirren, 1982).

Die Anwendung bei tierischen Spermien erfolgte zum ersten Mal beim Kaninchen zur Anfärbung und Differenzierung der Spermatozoen (Lenz, 1978). Bei porcinen Samenzellen wurden Testsimplets® erstmalig zur Färbung und Differenzierung im Rahmen einer Dissertation verwendet (Meissner, 1986). In dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob und in welchem Rahmen sich Testsimplets® zur morphologischen Untersuchung von Eberspermien eignen. Es wurde natives Sperma von Ebern der Deutschen Landrasse verwendet und die Flüssigfixierung mit Formolcitrat (Hancock, 1956) diente als Referenzmethode. Im Rahmen dieser Untersuchung wurde festgestellt, dass die Färbung mit Testsimplets® weder bei nativem Ebersamen, noch bei mit Natriumchloridlösung verdünntem Samen, ein zufriedenstellendes Ergebnis zeigt. Bei vorheriger Fixierung mit Formolcitrat ermöglicht das mikroskopische Bild allerdings eine zuverlässige Erkennung und Unterscheidung der zu untersuchenden Spermienstrukturen. Bei der gewählten Referenzmethode stellen sich die Spermien zwar farblos, aber sehr kontrastreich dar. Im Vergleich mit den damals gängigen Färbemethoden Karras und Giemsa, ist die Differenzierung der Spermien mit Hilfe der Testsimplets® einfacher und wesentlich deutlicher.

Für die Verwendung von Testsimplets® bei humanen Spermatozoen liegen vergleichende Studien mit Papanicolaou- und Shorr-Färbeprotokollen vor (Henkel et al., 2008). Es stellte sich heraus, dass die Ergebnisse bezüglich der Morphologie der zu untersuchenden Samenzellen bei der Papanicolaou-Färbung den Ergebnissen der Shorr-Färbung weitestgehend entsprechen. Bei der Färbung mit Testsimplets® kam es allerdings zu signifikant niedrigeren Anteilen morphologisch unveränderter Spermien, als bei den anderen beiden genannten Methoden. Besonders im Bereich des Spermischwanzes traten bei der Verwendung von Testsimplets® wesentlich mehr pathomorphologische Veränderungen auf. Somit wurde die Verwendung von Testsimplets® zur morphologischen Differenzierung bei humanen Spermatozoen nicht weiter empfohlen.

2.1.9 Methyl-Violett

Die Spermafarbe Methyl-Violett wird von der Firma BEG Schulze-Bremer GmbH vertrieben und dient der Untersuchung der Pathomorphologie von Eberspermien. Das Gemisch enthält sowohl eine spermienabtötende Substanz als auch den Farbstoff Methyl-Violett.

Es sind keine wissenschaftlichen Untersuchungen über diese Färbemethode bei porcinen Spermatozoen zu finden.

Die Farbe Methyl-Violett wurde beim Schwein lediglich dazu verwendet im Rahmen von Kotuntersuchungen bei Wildschweinen und Schlachtschweinen in der Tschechischen Republik Kryptosporidien nachzuweisen (Kvac et al., 2009; Nemejc et al., 2012). In einer weiteren wissenschaftlichen Untersuchung wurden die Auswirkungen einer retrograden Methyl-Violett-Infusion in die Speicheldrüse von Minischweinen untersucht. Es kam histologisch und makroskopisch zu Nekrosen und Fibrosen (Li et al., 1999).

2.1.10 Weitere Färbemethoden bei porcinen Samenzellen

Im Forschungszentrum für Tierproduktion und Tierernährung in Gödöllő (Ungarn) wurde 1989 die einzige vergleichende Untersuchung von Färbemethoden bei porcinen Samenzellen zur mikroskopischen Untersuchung durchgeführt. Bei den durch die Untersucher ausgewählten Färbungen handelt es sich um die Cerovsky-Färbung, die Farely-Färbung und die Wells-Awa-Färbung. Zusätzlich wurden die Samenzellpräparate von allen Ebern noch nativ mit dem Phasenkontrastmikroskop untersucht. Bei den gefundenen Anomalien handelte es sich um Akrosomveränderungen, Zytoplasmatropfen, „Haarnadel“-Defekte (Schleifenbildung) und Missbildungen des Kopfes. Die Zytoplasmatropfen ließen sich in der Wells-Awa-Färbung nicht zuverlässig nachweisen, wohingegen Akrosomveränderungen mit dieser Färbung hervorragend dargestellt wurden. Grundsätzlich erzielten die Cerovsky- und die Farely-Färbung die besten Färbeergebnisse. Die Methode nach Cerovsky eignet sich demnach am besten für die tiermedizinische Praxis, weil sie am schnellsten durchführbar ist und bezüglich der Akrosomdefekte eine ähnliche Sensitivität aufweist, wie die Wells-Awa-Färbung. Die Untersuchung der

ungefärbten Samenzellen mit dem Phasenkontrastmikroskop schnitt am schlechtesten ab (Wekerle und Sarlòs, 1989).

Bei der Samenuntersuchung sind besonders Färbungen, die sowohl die Vitalität, als auch den akrosomalen Zustand gut darstellen, interessant zur Beurteilung von Ejakulaten. Eine mögliche Färbung, die beide Eigenschaften vereint, ist die Kombination aus Trypanblau zur Unterscheidung der lebenden und toten Samenzellen und Giemsa zur Kennzeichnung des Akrosoms. Die postakrosomale Region von toten Samenzellen färbt sich durch Trypanblau dunkelblau an und bleibt bei lebenden Samenzellen farblos. Das Akrosom färbt sich mit Giemsa helllila bis dunkelrosa an und das Spermium ohne Akrosom bleibt farblos. Durch diese Kombination der Farbstoffe ist eine Unterscheidung zwischen einer echten und einer falschen Akrosomreaktion für den Untersucher auf einen Blick möglich. Bei einer echten Akrosomreaktion bilden sich zwischen der äußeren Akrosommembran und der darüber liegenden Plasmamembran einer fertilen Samenzelle kleine Vesikel. In der Färbung stellt sich dieses Spermium farblos mit einem helllila bis dunkelrosa gefärbten Akrosom dar. Die falsche Akrosomreaktion findet post mortem durch den Verlust des Akrosoms und der Plasmamembran statt. Das Spermium hat eine dunkelblaue postakrosomale Region und der vordere Anteil des Spermienkopfes bleibt farblos, weil kein Akrosom vorhanden ist (Didion et al., 1989).

Der Einsatz von Trypanblau zur Beurteilung der Vitalität wurde von Kovács und Foote (1992) mit Kongorot verglichen. Trypanblau ist dunkler und hat keinen negativen Effekt auf die Akrosomfärbung mit Giemsa. In dieser Studie konnten zehn verschiedene Klassen von Spermien unterschieden werden: Lebend mit intaktem Akrosom, gelockertem Akrosom, beschädigtem Akrosom, ohne Akrosom und ohne Akrosom und postakrosomalen Ring. Exakt die gleichen Abstufungen sind bei nicht vitalen Spermien möglich (Kovács und Foote, 1992). Eine weitere Möglichkeit eine Samenprobe auf ihre Funktionalität zu untersuchen, ist die Verwendung von fluoreszierenden Farbstoffen zusammen mit einem Fluoreszenzmikroskop. Propidiumiodid bindet und färbt zelluläre DNA und kann die Zellmembran der Samenzellen nur durchdringen, wenn sie beschädigt ist. Carboxyfluoreszeindiacetat kann durch die Zellmembran in die Zelle eindringen und wird dort durch unspezifische Esterasen zu freiem

Carboxyfluoresceindiacetat und fluoresziert folglich in intakten Samenzellen (Harrison und Vickers, 1990).

Desweiteren stellten Van der Hort und Maree (2009) die neue Färbemethode SpermBlue® als universelles Färbemittel für humanes und tierisches Sperma, unter anderem auch geeignet für die Automatisierte Samenzell-Analyse-Systeme, vor. Ein SpermBlue®-Färbekit besteht aus einem Fixans und einer Färbelösung. Die Anfertigung eines gefärbten Ausstriches dauert 25 Minuten. Im Vergleich mit der Papanicolaou-Färbung ist die SpermBlue®-Färbung wesentlich schneller und es entstehen keine Artefakte durch schrumpfende Zellen, weil kein Alkohol zur Fixierung benutzt wird. Spermac® färbt im Gegensatz zu SpermBlue® den Hintergrund stark an und ist für die Verwendung mit ASMA nicht geeignet. SpermBlue® zeigt den Unterschied zwischen den einzelnen Bestandteilen einer Samenzelle im Gegensatz zu Eosin-Nigrosin durch verschiedene Intensitäten der Blaufärbung an. Zusätzlich ist der Vorteil von SpermBlue® gegenüber Diff-Quick®, dass es nachweislich nicht zur Zellschwellung kommt. Es sollte allerdings beachtet werden, dass es je nach Spezies zu variierenden Färbemustern kommen kann (Van der Horst und Maree, 2009).

3 Material und Methoden

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurden von April bis September 2012 in der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere der Justus-Liebig-Universität in Gießen zwölf Portionen flüssigkonserviertes Ebersperma von der Besamungsstation Darmstadt/Griesheim der Zucht- und Besamungsunion Hessen eG untersucht. Jede Probe wurde zunächst in drei Teile aufgeteilt und über Nacht gelagert. Ein Teil der Besamungsportion wurde bei 6°C im Kühlschrank aufbewahrt, der zweite bei 38°C im Wasserbad und der dritte Teil wurde bei 18°C gelagert. Am nächsten Morgen wurde jede der drei Proben mit neun verschiedenen Färbemethoden gefärbt und auf pathomorphologische Veränderungen untersucht (Abbildung 1).

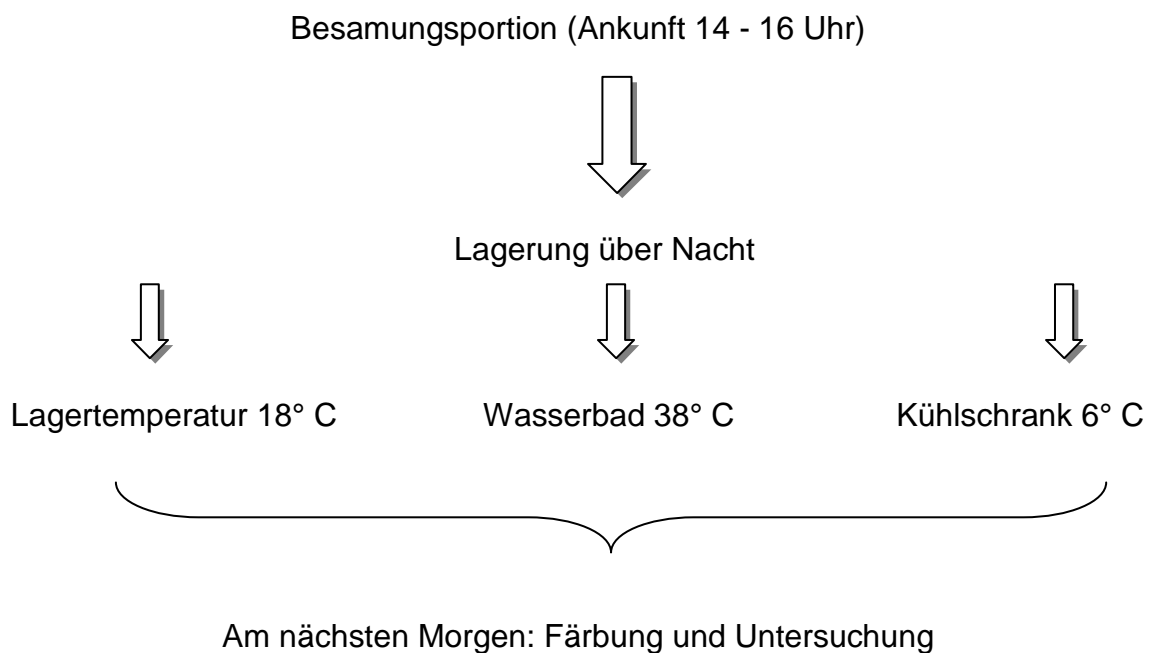


Abbildung 1: Arbeitsplan zur Untersuchung von Färbemethoden an flüssigkonservierten porcinen Samenzellen

3.1 Probenauswahl

Das flüssigkonservierte Sperma wurde bei der Besamungsstation Griesheim der Zucht- und Besamungsunion Hessen e.G. bestellt und in 90 ml Portionen geliefert. Im Besamungslabor erfolgte die Konservierung des Spermas mit einem BTS Verdünner mit Gentamycin der Firma Minitüb (Tiefenbach, Deutschland). Es wurden zwölf Besamungsportionen untersucht.

3.2 Vorbereitung und Untersuchung der Proben

3.2.1 Lagerung bei 18° C

Ein Teil der Besamungsportion wurde über Nacht in einem halbdunklen Raum bei 18° C gelagert und am folgenden Tag ausgestrichen, gefärbt und untersucht.

3.2.2 Lagerung im Wasserbad bei 38° C

Ein weiterer Teil der Besamungsportion wurde für eine Nacht bei 38° C im Wasserbad (WNB 45, Firma Memmert, Schwabach) gelagert und am folgenden Tag ausgestrichen, gefärbt und untersucht.

3.2.3 Lagerung im Kühlschrank bei 6° C

Der dritte Teil der Besamungsportion wurde für eine Nacht bei 6° C im Kühlschrank gelagert und am folgenden Tag ausgestrichen, gefärbt und untersucht.

3.3 Ausstriche

Es wurden zwei entfettete, vorgewärmte Objektträger (76 x 26 mm, Menzel Gläser, Braunschweig) verwendet. Mit einer Pipette wurde ein Tropfen Sperma (10 µl) auf einen Objektträger gegeben. Das Sperma wurde mit dem einen Objektträger aufgenommen und auf dem Anderen im 45° Winkel ausgestrichen. Nach einer Minute Trockenzeit erfolgte die Färbung des Ausstriches.

3.4 Färbemethoden

3.4.1 Eosin

Es erfolgte eine Mischung des Spermas mit einer 2%igen Eosinlösung. Zum Herstellen dieser Lösung wurden 2 g Eosin B (Merck Art. Nr. 1.5934.0025) und 3 g Trinatriumcitratdihydrat (Merck Art. Nr. 1.06448.0500) in 100 ml Aqua destillata gelöst. Es wurde 1 Tropfen Sperma und 1 - 2 Tropfen Eosinlösung auf den entfetteten, vorgewärmten Objektträger gegeben. Dann wurde das Eosin-Sperma-Gemisch mit der Kante eines Objektträgers aufgenommen und auf einen Weiteren mit gleichmäßigem Druck im 45° Winkel ausgestrichen (Busch und Holzmann, 2001; Busch und Waberski, 2007; Hoffmann, 2003). Das gefärbte Präparat wurde bei 400facher Vergrößerung unter dem Mikroskop ausgewertet (Abbildung 2).

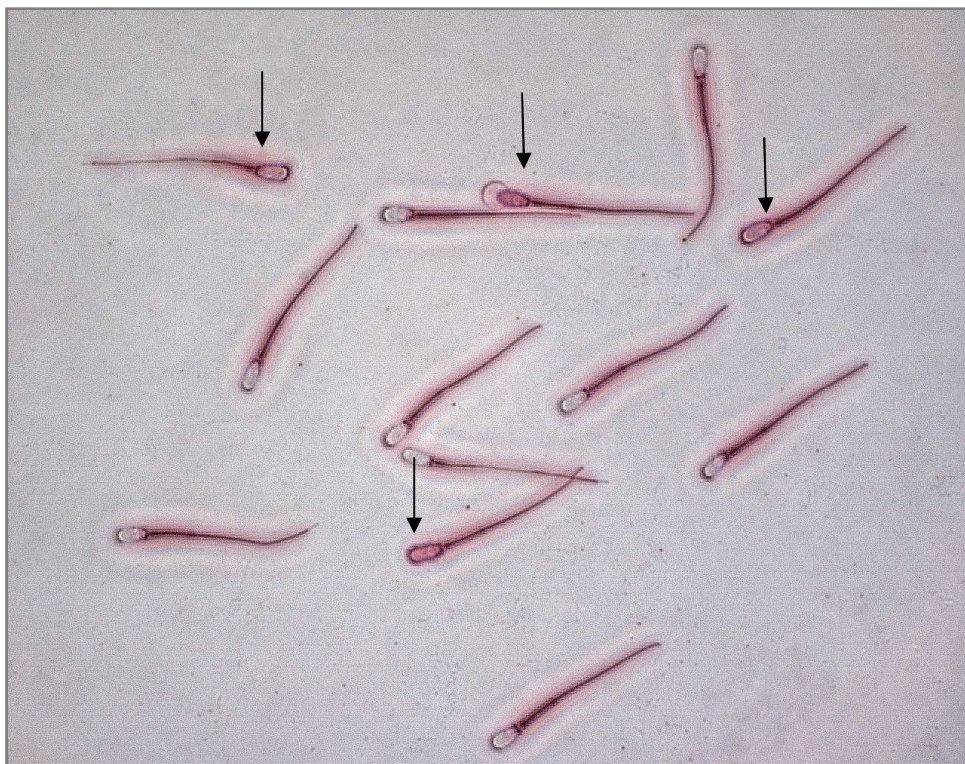


Abbildung 2: Eosin-Färbung, flüssigkonserviertes Ebersperma, 400fache Vergrößerung

Die Köpfe von vier Samenzellen sind rot angefärbt, was anzeigt, dass sie tot sind und dadurch ihre Zellmembran durchlässig für den Farbstoff ist (Markierung)

3.4.2 Eosin-Nigrosin

Die Färbelösung entsteht, indem 0,67 g Eosin Y (Merck Art. Nr. 102439) und 0,9 g Natriumchlorid in 100 ml Aqua destillata gelöst und dann 10 g Nigrosin (Merck Art. Nr. 115824) zu 100 ml Lösung hinzugefügt wurden. Das Gemisch wurde gekocht und auf Raumtemperatur herunter gekühlt. Danach wurde die neu gemischte Färbelösung gefiltert (90 g / m² Filterpapier) und in einer dunklen Flasche zur Lagerung gegeben. Zur Anfertigung des Ausstriches wurde zuerst das Sperma aufgeschüttelt und dann ein Tropfen Sperma mit ein bis zwei Tropfen Eosin-Nigrosin Lösung vermischt. Nach einer Wartezeit von 30 Sekunden wurde ein Ausstrich der gefärbten Samenzellprobe auf einem Objektträger angefertigt (Dott und Foster, 1972, World Health Organisation, 2010). Sofort nach dem Trocknen erfolgte die Untersuchung bei 1000facher Vergrößerung und Immersionsöl (A0699, Firma Applichem, Darmstadt) mit dem Lichtmikroskop (Abbildung 3). Hier wurden vier Objektträger gefärbt, um für die Wiederholungsuntersuchung jeweils einen nicht mit Öl in Kontakt gekommen Objektträger zur Verfügung zu haben.



Abbildung 3: Eosin-Nigrosin-Färbung, flüssigkonserviertes Ebersperma, 1000fache Vergrößerung mit Immersionsöl

3.4.3 Diff-Quick®

Die Färbung erfolgte mit dem Diff-Quick®-Schnellfärbeset der Firma Medion Diagnostics (Düdingen, Schweiz). Das Set besteht aus einer Fixierlösung und zwei Färbelösungen. Die erste Lösung (Diff-Quick-Fix) beinhaltet Fast Green gelöst in Methanol und fixiert die Samenzellen auf dem Objektträger. Diff-Quick I ist ein saures Farbreagens, das Eosin G in einem Phosphatpuffer mit Natriumazid enthält und basische Zellanteile rot färbt. Diff-Quick II ist ein basisches Farbreagens, das aus Azur A, Methylenblau und ebenfalls einem Phosphatpuffer besteht. Diff Quick II färbt saure Zellbestandteile blau an. Die Färbung wurde wie in Tabelle 1 beschrieben durchgeführt.

Tabelle 1: Durchführung der Diff-Quick®-Färbung zur Untersuchung der Pathomorphologie von flüssigkonservierten Eberspermien

| Bezeichnung | Inhaltsstoff | Funktion | Tauchvorgang |
|----------------|--|------------------|--------------|
| Diff-Quick Fix | Fast Green, Methanol | Fixierung | 15 sec |
| Diff-Quick I | Eosin G, Phosphatpuffer, Natriumazid | Farbreagens rot | 10 sec |
| Diff-Quick II | Azur A, Methylenblau, Phosphatpuffer | Farbreagens blau | 5 sec |

Um überflüssige Reagenzien zu entfernen, wurde der Objektträger zwischen den einzelnen Schritten vertikal auf saugendes Papier gestellt und abschließend auf der Rückseite mit fließendem Wasser abgespült. Die Beurteilung erfolgte nach dem Trocken mit 400facher Vergrößerung mit dem Lichtmikroskop (Abbildung 4).



Abbildung 4: Diff-Quick-Färbung, flüssigkonserviertes Ebersperma, 400fache Vergrößerung

3.4.4 Hemacolor®

Die Hemacolor®-Färbung der Firma Merck Chemicals (Darmstadt, Deutschland) besteht aus drei verschiedenen Lösungen, die in Glasküvetten aufbewahrt werden.

Die Färbung wurde wie in Tabelle 2 beschrieben durchgeführt.

Tabelle 2: Durchführung der Hemacolor®-Färbung zur Untersuchung der Pathomorphologie von flüssigkonservierten Eberspermien

| Bezeichnung | Inhaltsstoff | Funktion | Tauchvorgang |
|-------------|-------------------------|------------------|--------------|
| Lösung 1 | Methanol | Fixierung | 5 x 1 sec |
| Lösung 2 | Eosin G | Farbreagenz rot | 3 x 1 sec |
| Lösung 3 | Azur B, Methylenblau | Farbreagenz blau | 6 x 1 sec |

Um überflüssige Lösung zu entfernen, wurde der Objektträger zwischen den einzelnen Schritten vertikal auf saugendes Papier gestellt und am Ende die

Rückseite unter fließendem Wasser abgespült. Die Beurteilung erfolgte in 400facher Vergrößerung (Abbildung 5).

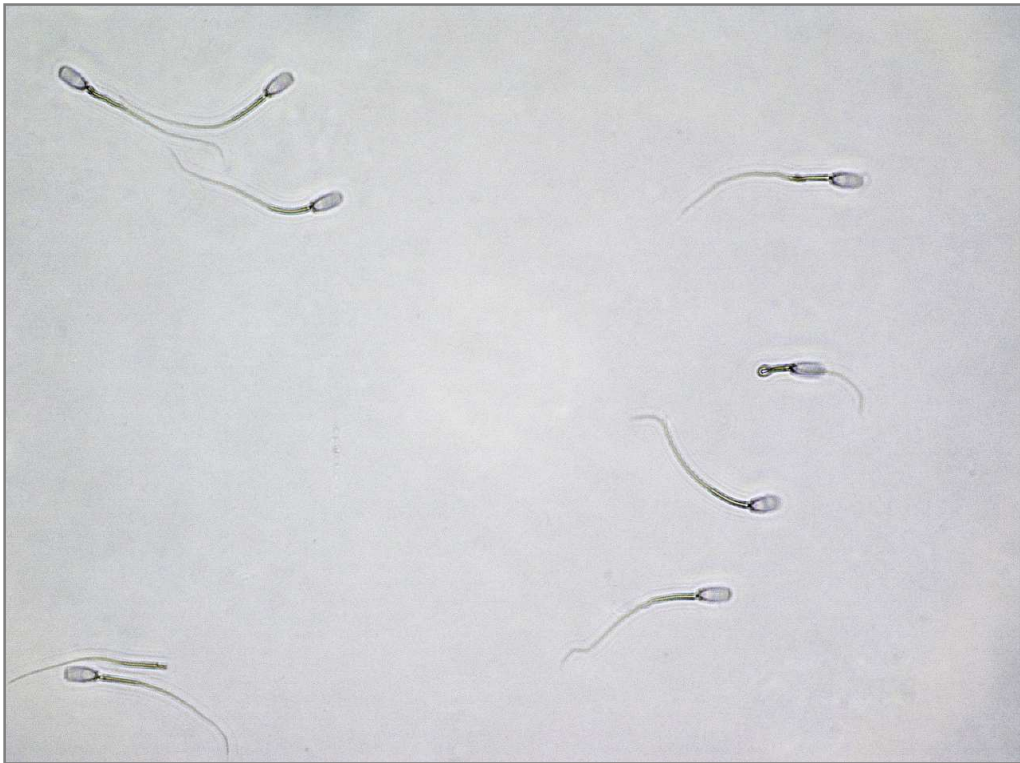


Abbildung 5: Hemacolor-Färbung, flüssigkonserviertes Ebersperma, 400fache Vergrößerung

3.4.5 Sangodiff-G®

Sangodiff G® ist eine mit einem Farbgemisch beschichtete Folie, die von der Firma Merck Chemicals (Darmstadt, Deutschland) vertrieben wird. Die Beschichtung ist ein Gemisch aus Azur, Eosin und Methylenblau und entspricht demnach dem Färbemuster einer klassischen Giemsa-Färbung. Das Akrosom wird im Gegensatz zum Zytoplasma, welches sich hellrosa darstellt, weinrot gefärbt. Nachdem der Ausstrich luftgetrocknet wurde, erfolgte die Fixierung in Methanol und anschließend erneuten Lufttrocknen. Nachdem ein bis zwei Tropfen der mitgelieferten Pufferlösung aufgetragen wurde, erfolgte das Auflegen der Färbefolie. Dabei ist besonders darauf zu achten, dass die Färbefolie mit dem nichtbedruckten Ende an der beschrifteten Seite des Objektträgers angelegt und vorsichtig über den Objektträger gestrichen wird. Wichtig ist, dass der Ausdruck der Firma Merck in Spiegelschrift zu lesen ist

und die Folie am Ende des Objektträgers leicht übersteht, damit man sie nach der Färbung besser wieder abziehen kann. Nach einer Einwirkzeit von zehn Minuten ist der Färbeprozess abgeschlossen. Auch dieser Objektträger wird mit der Rückseite unter fließendes Wasser gehalten und dann zum Trocknen senkrecht auf saugendes Papier gestellt. Die Beurteilung erfolgt mit aufgeklebter Folie bei 400facher Vergrößerung (Abbildung 6).



Abbildung 6: Sangodiff-G-Färbung, flüssigkonserviertes Ebersperma, 400fache Vergrößerung

3.4.6 Spermac®

Eine Färbemethode zur Darstellung von Samenzellen und Beurteilung der Pathomorphologie, stellt die Spermac®-Färbung der Firma Minitüb (Tiefenbach, Deutschland) dar. Besonders gut lässt sich in dieser Färbung die Kopfkappe und somit der akrosomale Status beurteilen. Diese Färbemethode wurde nach der dem Färbeset beiliegenden Anleitung durchgeführt und besteht aus einem Fixans und drei Färbereagenzien.

Die erste Lösung ist das Fixans, welches aus 4%igem Formalin und Wasser besteht. Die zweite Lösung ist rot und beinhaltet Rose Bengal, Neutralrot und Ethylalkohol. Die dritte Lösung ist von hellgrüner Farbe und beinhaltet Pyronin Y, Molybdatophosphorsäure und Ethylalkohol. Die vierte Lösung ist dunkelgrün und besteht aus Janusgrün und Fast Green FCF. Die Färbung wurde wie in Tabelle 3 beschrieben durchgeführt.

Tabelle 3: Durchführung der Spermac®-Färbung zur Untersuchung der Pathomorphologie von flüssigkonservierten Eberspermien

| Bezeichnung | Inhaltsstoff | Funktion | Arbeitsablauf |
|-------------|---|---------------------------|--------------------|
| Lösung 1 | 4% iges Formalin, Wasser | Fixierung | 5-6 min eintauchen |
| Lösung 2 | Rose Bengal, Neutralrot, Ethylalkohol | Farbreagenz rot | 1 min eintauchen |
| Lösung 3 | Pyronin Y, Molybdatophosphor- säure, Ethylalkohol | Farbreagenz hellgrün | 1 min eintauchen |
| Lösung 4 | Janusgrün, Fast Green FCF | Farbreagenz dunkelgrün | 1 min eintauchen |

Zwischen den einzelnen Schritten wurde der Objektträger fünf- bis sechsmal vorsichtig in Wasser getaucht und senkrecht auf saugendem Papier abgetupft. Das Ergebnis dieser Färbung war eine dunkelgrüne Färbung des Akrosoms und ein roter Kern. Die Äquatorialregion stellt sich hellgrün dar, Mittelstück und Schwanz des Spermiums sind grün angefärbt. Die Beurteilung erfolgte lichtmikroskopisch mit 1000fachen Vergrößerung und Immersionsöl (Abbildung 7). Es wurden vier Objektträger gefärbt, um für die Wiederholungsuntersuchung jeweils einen nicht mit Öl in Kontakt gekommen Objektträger zur Verfügung zu haben.

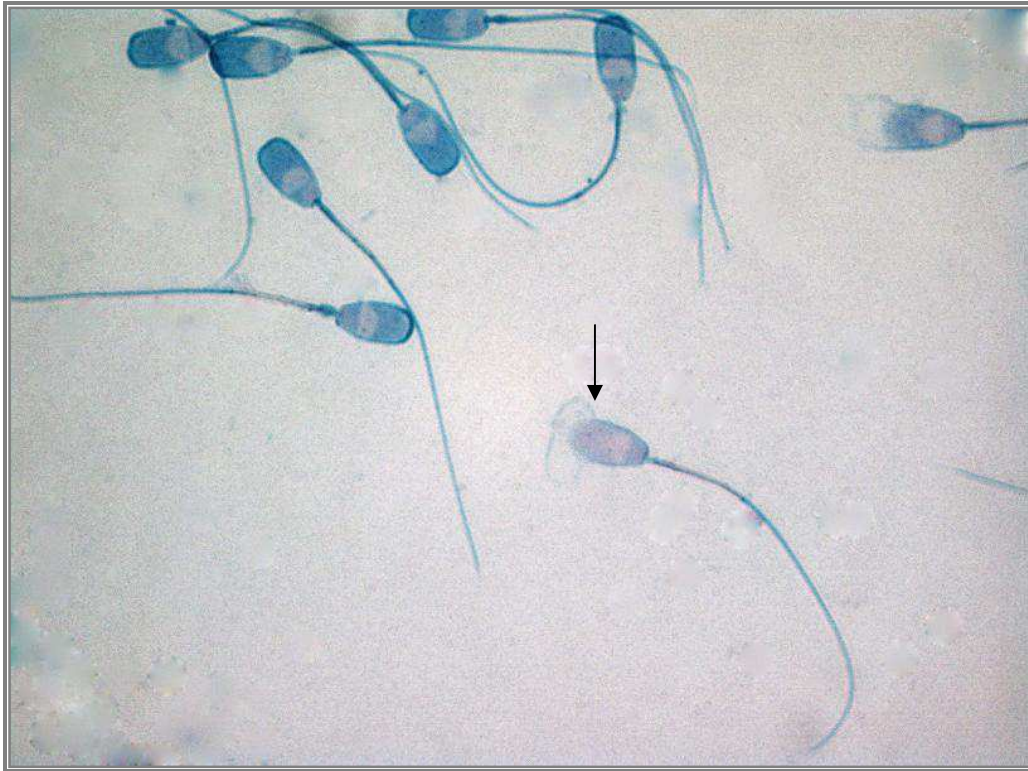


Abbildung 7: Spermac-Färbung, flüssigkonserviertes Ebersperma, 1000fache Vergrößerung mit Immersionsöl
Zentrales Spermium mit abgelöster Kopfkappe, erkennbar an der roten Färbung des Kopfes (Markierung)

3.4.7 Formolcitrat-Bengalrosa

Die Formolcitrat-Begalrosa-Färbung ist eine Färbemethode, die besonders Veränderungen des Akrosoms sichtbar macht. Hier wurden zwei bis drei Tropfen Sperma mit 0,3 ml Formolcitrat-Bengalrosa-Lösung gemischt. Die Herstellung dieser Lösung erfolgte durch eine Vermischung von 2,9 g Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat (Merck Art. Nr. 106448), 4 ml 35% Formaldehydlösung und 0,156 g Rose Bengal (SIGMA R 3877). Anschließend wurde die Mischung mit Aqua bidestillata auf 100 ml aufgefüllt. Nachdem die Spermaprobe mit der Formolcitrat-Begalrosa-Lösung vermischt wurde, erfolgte das Aufbringen eines Tropfens auf den Objektträger und das Abdecken mit einem Deckgläschen. Bei dieser Färbung benötigten die Spermien 30 Minuten, um sich flach abzusenken, damit besonders die Kopfform korrekt beurteilt werden kann (Riesenbeck et al., 2001). Die Beurteilung erfolgte mit 1000facher Vergrößerung und Immersionsöl (Abbildung 8).



Abbildung 8: Formolcitrat-Bengalrosa-Färbung, flüssigkonserviertes Ebersperma, 1000fache Vergrößerung mit Immersionsöl

3.4.8 Testsimplets®

Die Firma Waldeck aus Münster bietet unter dem Produktnamen Testsimplets® Objektträger mit einer homogenen Farbstoffbeschichtung aus Neu-Methylenblau und Cresy-Violett-Acetat an. Beide Farbstoffe gehören zu den basischen Farbstoffen und eignen sich besonders gut zum Anfärben von DNS-haltigen Zellanteilen, wie Zellkern, Ribosomen und raues Endoplasmatisches Retikulum. Zur Durchführung der Färbung gibt man einen Tropfen Sperma auf ein Deckglas und legt dieses auf den farbbeschichteten Objektträger. Nach 5 - 15 Minuten wurden die gefärbten Spermien beurteilt, wobei das Färbemuster der klassischen Färbung nach Pappenheim entspricht. Die Beurteilung erfolgte bei 1000facher Vergrößerung mit Immersionsöl (Abbildung 9).

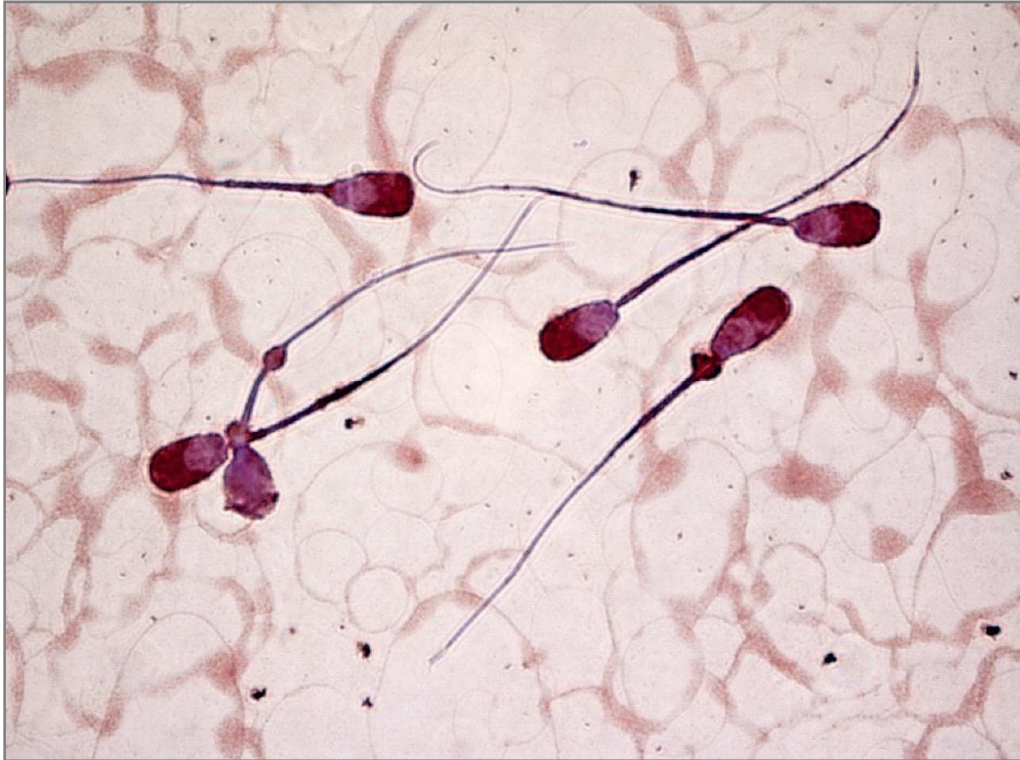


Abbildung 9: Testsimpler®, flüssigkonserviertes Ebersperma, 1000fache Vergrößerung mit Immersionsöl

3.4.9 Methyl-Violett

Diese Spermafarbe wird von der Firma BEG Schulze Bremer GmbH aus Dülmen-Rorup vertrieben und beinhaltet Methyl-Violett und eine spermienabtötende Substanz. Zur Durchführung wurde ein Tropfen Sperma und ein Tropfen Methyl-Violett auf einen Objektträger aufgetragen und von einem Deckglas bedeckt. Nachdem es zehn Minuten liegen gelassen wurde, kann das Sperma-Farbgemisch unter dem Mikroskop bei 400facher Vergrößerung betrachtet werden (Abbildung 10).



Abbildung 10: Methyl-Violett, flüssigkonserviertes Ebersperma, 400fache Vergrößerung (Spermien liegen in unterschiedlichen Bildebenen)

3.5 Beurteilungskriterien

Zur Beurteilung der Samenzellen wurde jeder gefärbte Objektträger mäanderförmig durchmustert, 200 Spermien auf pathomorphologische Veränderungen untersucht, mit dem elektronischen Zählgerät („Assistent“ Counter AC-15; Karl Hecht, Sondheim) ausgezählt und ihr prozentualer Anteil berechnet. Die Untersuchung der Pathomorphologie erfolgte nach den Vorgaben der Untersuchung von menschlichen Samenzellen aus dem „WHO laboratory manuel for examination and processing of human semem“ (2010), angepasst an die Erkenntnisse zur Pathomorphologie von Eberspermien nach „The morphology of boar spermatozoa“ von Hancock (1956). In der Untersuchung orientiert man sich am grundsätzlichen Aufbau eines Spermiums, welches aus einem Kopf mit dem Akrosom, Hals, Mittel-, Haupt- und Endstück besteht (Abbildung 11).

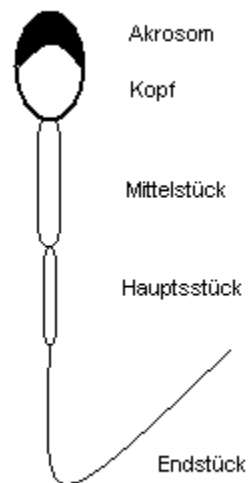


Abbildung 11: Aufbau einer Samenzelle

Der Kopf der Samenzelle sollte oval, glatt und regelmäßig geformt sein und eine gut abgrenzbare akrosomale Region aufweisen. Er sollte doppelt so lang wie breit sein.

Pathologisch ist ein zu großer oder zu kleiner Kopf, ein doppelter Kopf oder eine konische, birnenförmige oder zu runde Form. Das Mittelstück sollte schlank, regelmäßig und nicht abgeknickt sein und sollte nicht viel länger als der Kopf des Spermiums sein. Es sollte gerade am Kopf ansetzen und nicht verdickt oder zu verschmälert sein. Beim Schwein kommen Cytoplasmatropfen sehr häufig vor. Je weiter distal der Cytoplasmatropfen sich am Spermium befindet, desto reifer ist die Samenzelle. Wenn Cytoplasmatropfen vorhanden sind, sollten sie nicht mehr als ein Drittel der Größe des Spermienkopfes aufweisen. Das Hauptstück sollte dünner als das Mittelstück sein und darf in einem stumpfen Winkel gebogen sein. Es sollte nicht zu kurz, gebrochen, doppelt, scharf abgeknickt oder aufgerollt sein. Das Endstück ist ungefähr dreimal so lang wie das Mittelstück und weist keine speziellen Besonderheiten auf. Wenn mehrere Veränderungen an demselben Spermium auftreten, werden nur die schwerwiegendsten protokolliert. In diesem Fall ergibt sich folgende Reihenfolge: Halsbrüche – Kopfkappenveränderungen – Kopfdeformationen – Schwanzveränderungen. Bei den Schwanzveränderungen gilt die Reihenfolge: Schwanzansatz – Schwanzform – Plasmotropfen (BUSCH und WABERSKI,

2007). Insgesamt erfolgte die Beurteilung, wie in Tabelle 4 dargestellt, und die Untersuchungsergebnisse wurden in einer Auswertungstabelle festgehalten.

Tabelle 4: Beurteilungskriterien für die Untersuchung der Pathomorphologie von flüssigkonservierten Eberspermien

| Kopf | Akrosom |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Unregelmäßig geformt • Rund • Lanzenförmig • Birnenförmig • Zu groß/z zu klein • Doppelkopf | <ul style="list-style-type: none"> • Zu groß/z zu klein • In Ablösung • Nicht vorhanden • Vakuolen |
| Mittelstück | Hauptstück |
| <ul style="list-style-type: none"> • Asymmetrisch • Gebrochen • Verdickt/schmal | <ul style="list-style-type: none"> • Schleife • Aufgerollt • Scharf abgeknickt • Gebrochen |
| Sekundäre/Tertiäre Veränderungen | Plasmotropfen |
| <ul style="list-style-type: none"> • Abgelöste Köpfe | <ul style="list-style-type: none"> • Mittelstück • Hauptstück • Schwanz |

Zusätzlich wurden folgende Parameter zur Einschätzung der Färbequalität beurteilt:

- Farbintensität (blass, mäßig, gut, intensiv)
- Detailerkennbarkeit (schlecht, mäßig, gut, deutlich)
- Kontrast (schlecht, mäßig, gut, deutlich)

3.6 Lagerung

Die Lagerung der Objektträger erfolgte zwischen den Untersuchungen in einem Rotilabo®-Objektträgerkasten (Firma Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) in einem dunklen Schrank in der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz in Gießen bei Raumtemperatur.

3.7 Wiederholungsuntersuchung

Um die Lagerungsstabilität der Ausstriche zu beurteilen, wurden in festgelegten Abständen Wiederholungsuntersuchungen durchgeführt. Die erste Wiederholung nach der Erstuntersuchung (Zeitpunkt 1) erfolgte nach 24 Stunden (Zeitpunkt 2), die Zweite nach sieben Tagen (Zeitpunkt 3). Abschließend wurden die Ausstriche nach drei Monaten beurteilt (Zeitpunkt 4). Bei den Wiederholungsuntersuchungen wurde auf Veränderungen der Auswertbarkeit im Verhältnis zur Erstuntersuchung geachtet, um eine Aussage über die Archivierbarkeit der gefärbten Ausstriche bei den unterschiedlichen Färbemethoden treffen zu können.

3.8 Finanzieller und zeitlicher Aufwand

Im Anschluss an die Untersuchung wurden die Kosten pro gefärbtes Präparat berechnet. Zusätzlich erfolgte eine Erfassung des zeitlichen Aufwandes, indem die Herstellungszeit für das einzelne Präparat und die Auswertungszeit bei den ersten sechs Samenzellproben festgehalten wurde. Es erfolgte eine zusätzliche Berechnung auf der Grundlage des Stundenlohnes einer tiermedizinischen Fachangestellten mit der Arbeitszeit und den Kosten für die verwendeten Materialien.

3.9 Reproduzierbarkeit der Untersuchungsergebnisse bei unterschiedlichen Untersuchungstechniken und Untersuchern

In diesem Experiment sollte die Frage beantwortet werden, ob es für die Interpretation des Ausstriches eine Rolle spielt, ob man ihn mäanderförmig oder ungerichtet ohne ein bestimmtes Schema durchmustert.

Die Untersuchung wurde mit den Färbungen Eosin und Hemacolor® durchgeführt. Die Beurteilung erfolgte durch 40 Tiermedizinstudenten, welche die Präparate entweder ungerichtet auf pathomorphologische Veränderung und im Fall des Eosinausstriches auch auf die Verteilung der lebenden zu den toten Spermien untersuchten oder die mäanderförmige Durchmusterung bei den gleichen Präparaten angewendeten. Diese Auswertung erfolgte an drei verschiedenen Untersuchungstagen und drei unterschiedlichen Samenzellproben im Rahmen des Kurses zur Spermatologischen Untersuchung, der sich im Rotationsjahr befindlichen Tiermedizinstudenten, mit jeweils 12-14 Studenten an zahlreichen Ausstrichen der gleichen Samenzellprobe. Von jedem Untersucher wurden zwei Präparate analysiert und bewertet, die alle im Vorfeld ausgestrichen, gefärbt und voruntersucht waren. Alle Teilnehmer nahmen freiwillig an dem Experiment teil und haben unmittelbar vor dem Versuch eine kurze, einheitliche Einweisung in die pathomorphologische Untersuchung und Vitalitätsbeurteilung von gefärbten Samenzellausstrichen beim Eber erhalten. Als Beurteilungshilfe wurde den Studierenden eine schematische Schwarz-Weiß-Zeichnung mit den unterschiedlichen pathomorphologischen Veränderungen (Anhang Abbildung 12) ausgehändigt. Die Teilnehmer mussten die Veränderungen in Kopf-, Mittelstück-, Schwanzveränderungen und Zytoplasmotropfen unterteilen und jeweils 200 Spermien pro Ausstrich untersuchen und beurteilen. Die Ergebnisse wurden von den Studenten in einer Tabelle festgehalten (Anhang Tabelle 5).

3.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten wurde von der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen (Leitung: Dr. rer. nat. Klaus Failing) durchgeführt. Die Verwaltung und die graphische Darstellung der gewonnenen Daten erfolgte mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft® Office Excel 2007 (Microsoft Corporation). Die statistischen Methoden zur Überprüfung auf statistisch signifikante Effekte der Einflussgrößen Färbemethode, Aufbewahrungsdauer und Zeitpunkt auf die mittlere Häufigkeit der pathomorphologischen Spermaveränderungen wurden dem

Statistikprogrammpaket R entnommen (siehe Literaturverzeichnis). Da es sich bei den Ausprägungen der untersuchten Merkmale um Zählergebnisse so genannter „seltener Ereignisse“ handelt, deren statistische Verteilung sich durch die Poisson-Verteilung approximieren lässt, wurde in Anlehnung an die Versuchsplanung für jede Variable eine Poisson-Regression nach dem gemischten Modell (generalized linear mixed-model Poisson-regression) mit dem R-Modul glmmPQL durchgeführt.

Zuerst erfolgte eine Anpassung des generalized-linear-mixed-model-Poisson-Regressionsmodells für die Zählergebnisse der pathomorphologischen Untersuchung der unterschiedlich gefärbten, gelagerten und zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersuchten Samenzellpräparate. Darauf baut die Berechnung der Chi-Quadrat-Test-Statistik nach dem Wald-Test zur simultanen Überprüfung der Unterschiede aller Stufen der untersuchten Faktoren mit Berechnung der zugehörigen p-Werte auf.

Im Einzelnen wurde diese Methoden zum Vergleich der Aufbewahrungstemperaturen innerhalb jeder Färbung, zum Vergleich der Färbungen über die Temperatur hinweg und zum Vergleich der Färbungen innerhalb der Temperatur jeweils zum ersten Beobachtungszeitpunkt durchgeführt. Darüber hinaus fand der Vergleich der Zeitpunkte über die Temperaturen hinweg getrennt nach Färbungen mit denselben Methoden statt. Bei der gleichzeitigen Berücksichtigung von zwei Einflussfaktoren wurde auch deren Wechselwirkung auf ihre statistische Bedeutung hin untersucht.

Die graphische und tabellarische Darstellung der gewonnenen Daten wurde ebenso mit dem Programm Microsoft® Office Excel 2007 (Microsoft Corporation) durchgeführt. Zur Beschreibung der Daten wurden arithmetische Mittelwerte (\bar{x}), Standardabweichung (SD), Spannweite (R) und der Median berechnet und tabellarisch wiedergegeben. Die rein deskriptive Angabe des Mittelwertes und der Standardabweichung (obwohl keine Normalverteilung vorliegt) erfolgte in der Regel bis auf zwei Stellen hinter dem Komma. Für alle Berechnungen gilt $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant und $p \leq 0,01$ als statistisch hochsignifikant.

4 Ergebnisse

4.1 Vergleich des zeitlichen Aufwandes

Um die Färbemethoden hinsichtlich des zeitlichen Aufwandes miteinander vergleichen zu können, wurde die durchschnittliche Arbeitszeit zur Anfertigung von einem gefärbten Präparat bei den ersten sechs Samenzellproben dokumentiert. Die Zeit zur Herstellung bis zur Auswertbarkeit des Präparates (Herstellungszeit), wurde genauso wie die Dauer der Auswertung (Auswertungszeit) erfasst.

Der arithmetische Mittelwert der Zeit zur Anfertigung eines Nativausstriches beträgt 0,17 Minuten (Min.) mit einer Standardabweichung von 1,94 Sekunden (Sek.). Das Trocknen des Ausstriches dauert durchschnittlich 0,51 Min. \pm 2,48 Sek.

Bei der Eosin-Färbung setzt sich die Herstellungszeit aus durchschnittlich 0,24 Min. \pm 1,87 Sek. zur Anfertigung des gefärbten Ausstriches und durchschnittlich 2,93 Min. \pm 11,29 Sek. zum Trocknen zusammen.

Die Eosin-Nigrosin-Lösung wird zusammen mit dem Sperma ausgestrichen. Es dauert durchschnittlich 0,74 Min. \pm 1,87 Sek. bis zum gefärbten Ausstrich, weil 30 Sek. Wartezeit zwischen der Vermischung des Farb- und des Spermatropfen und des Ausstrichvorganges liegen. Wenn zusätzlich die Vitalität beurteilt wurde, was nur mit den Färbungen Eosin und Eosin-Nigrosin möglich ist, kommen für diesen Arbeitsschritt durchschnittlich 4,15 Min. \pm 11,65 Sek. bzw. 4,97 Min. \pm 7,99 Sek. hinzu.

Für die Diff-Quick®-Färbung wurde zuerst ein Nativausstrich angefertigt und innerhalb von durchschnittlich 0,51 Min. \pm 2,48 Sek. getrocknet. Daraufhin findet der eigentliche Färbeprozess in durchschnittlich 0,99 Min. \pm 3,14 Sek. statt und der zweite Trockenvorgang in 4,06 Min. \pm 13,84 Sek.

Da die Färbung mit Hemacolor®, abgesehen von den genauen Eintauchzeiten, nach den gleichen Prinzip wie die Diff-Quick®-Färbung erfolgt, dauert außer dem eigentlichen Färbeprozess, der hier durchschnittlich 0,99 Min. \pm 2,71 Sek. beträgt, die sonstige Herstellung und Auswertung eines solchen Präparates genauso lange.

Ergebnisse

Zur Herstellung eines Sangodiff-G®-Färbefolienpräparates wird ein getrockneter Nativausstrich für 10 Sek. in Methanol fixiert und dann durchschnittlich 0,49 Min. \pm 3,14 Sek. getrocknet. Weiterhin wurde die Färbefolie für 10 Min. aufgelegt und nach dem Abnehmen und Spülen der Rückseite des Präparates mit Wasser erfolgte eine erneute Trocknung über durchschnittlich 3,08 Min. \pm 5,93 Sek. Danach kann das gefärbte Präparat ausgewertet werden.

Für die Erstellung eines mit Spermac® gefärbten Präparates wurde ein getrockneter Nativausstrich angefertigt. Nach einer Fixierung in Formalin und Wasser für 5 Min., dauert der eigentliche Färbeprozess 4 Min. Darauf folgen weitere 2,96 Min. \pm 9,75 Sek. Trocknungszeit bis zur Beurteilung des Präparates in der 1000fachen Vergrößerung.

Bei der Formolcitrat-Bengalrosa-Färbung dauert die Herstellung des fertigen Deckglaspräparates durchschnittlich 0,49 Min. \pm 1,72 Sek. Danach benötigen die Spermienköpfe laut Herstellerangaben 30 Min., aus eigener Erfahrung durchschnittlich 45 Min., um sich flach zu lagern.

Wenn Samenzellpräparate mit Testsimplets® gefärbt werden, soll laut Hersteller eine Wartezeit von 5 bis 15 Min. bis zur Auswertung des Präparates eingehalten werden. Es zeigte sich, dass mindestens eine bis zu teilweise drei Stunden abzuwarten ist, bis das Präparat gefärbt ist und die Spermienköpfe sich alle flach gelagert haben. Für die Berechnung wurde von einer Stunde Wartezeit ausgegangen. Die Auswertung erfolgt ebenfalls in der 1000fachen Vergrößerung innerhalb von durchschnittlich 7,45 Min. \pm 18,95 Sek. Folglich dauert der gesamte Vorgang bis zum aussagekräftigen Ergebnis mindestens 68 Min. und bis zu 3,13 Std.

Bei der Färbung mit Methyl-Violett ist das erforderliche Deckglaspräparat innerhalb von durchschnittlich 0,46 Min. \pm 2,73 Sek. hergestellt. Danach soll das Präparat laut Herstellerangaben nach 10 Min. beurteilbar sein, was diese Untersuchung nicht bestätigen kann. Bei der beschriebenen Verwendung von einem Tropfen Sperma und einem Tropfen Methyl-Violett dauert es mindestens eine Stunde bis zu drei Stunden (Berechnung mit einer Stunde Wartezeit) bis nicht mehr der größte Anteil der Spermien schwimmend ist und eine lanzenförmige Kopfform aufweist. Folglich ist das Präparat erst nach mindestens 66 Min. bis zu 3,1 Std. beurteilbar.

Ergebnisse

Die nachfolgende Tabelle zeigt die durchschnittlichen Arbeitszeiten mit der dazugehörigen Standardabweichung (Tabelle 6).

Tabelle 6: Durchschnittliche Arbeitszeiten zur Herstellung, Auswertung und Gesamtzeit eines gefärbten Präparates in aufsteigender Reihenfolge der Gesamtzeit (Min. = Minuten, Sek. = Sekunden)

| Färbemethode | Herstellungszeit pro gefärbten Objektträger (Min. ± Sek.) | Auswertungszeit pro gefärbten Objektträger (Min. ± Sek.) | Gesamtzeit pro gefärbten Objektträger (Min. ± Sek.) |
|-----------------------------|--|---|--|
| Eosin | 3,17 ± 10,42 | 5 ± 12,78 | 8,17 ± 23,2 (+ Vitalität 4,15 ± 11,65) |
| Eosin-Nigrosin | 3,67 ± 10,42 | 6,7 ± 11,65 | 10,37 ± 22,07 (+ Vitalität 4,97 ± 7,99) |
| Diff-Quick® | 5,73 ± 11,97 | 5,03 ± 8,67 | 10,76 ± 20,94 |
| Hemacolor® | 5,73 ± 15,28 | 5,03 ± 8,67 | 10,76 ± 23,95 |
| Spermac® | 12,64 ± 10,09 | 6,9 ± 12,16 | 19,54 ± 22,25 |
| Sangodiff G® | 14,43 ± 8,02 | 5,2 ± 9,96 | 19,63 ± 17,98 |
| Formolcitrat- Bengalrosa | 45,49 ± 1,72 | 6,48 ± 10,6 | 51,97 ± 12,32. |
| Methyl-Violett | 60,46 ± 2,73 | 4,98 ± 5,82 | 65,44 ± 8,55 |
| Testsimplerts® | 60,22 ± 0,89 | 7,45 ± 18,95 | 67,67 ± 19,84 |

4.2 Vergleich des finanziellen Aufwandes

Es wurden die Kosten pro gefärbten Objektträger berechnet. Im Folgenden wurden Hilfsmittel wie Mikroskop und Pipetten, die zur Untersuchung von allen mit den unterschiedlichen Methoden gefärbten Präparaten benötigt werden, in diese Berechnung nicht mit einbezogen. Bei Färbelösungen, in die die Objektträger zur Färbung eingetaucht werden, wurde mit Hilfe der auf der Packungsbeilage angegebenen Anzahl an möglichen Färbevorgängen pro Färbekit, die Verbrauchsmenge pro Färbevorgang berechnet. Bei der Färbung

Ergebnisse

mit Diff-Quick® reichen jeweils 500 ml der unterschiedlichen Reagenzien zum Preis von 319 € für 300 Färbvorgänge. Folglich werden für eine Färbung jeweils 1,66 ml zum Gesamtpreis von 1,06 € pro Färbvorgang benötigt. Die Färbung mit Spermac® besteht aus vier Reagenzien mit jeweils 50 ml zum Preis von 148,16 € und es werden pro Färbvorgang jeweils 0,25 ml zum Gesamtpreis von 0,74€ benötigt. Bei der Färbung mit Hemacolor® werden für 50-200 Färbvorgänge drei Reagenzien mit jeweils 100 ml zum Preis von 60 € gebraucht. Die Kosten pro Färbvorgang betragen somit bei einem Verbrauch von 0,5 bis 2 ml pro Reagenz 0,3 bis 1,20 €. Die nachfolgende Tabelle stellt die Verbrauchsmaterialien für die verschiedenen Färbungen und die daraus resultierenden Kosten pro gefärbten Objektträger dar (Tabelle 7).

Um einen praxisrelevanten Vergleich zu haben, wurde zusätzlich die Gesamtzeit mit den Arbeitsstunden einer Tiermedizinischen Fachangestellten verrechnet. Ausgehend von einem monatlichen Gehalt von 1500 € und einer 40-Stunden-Woche bei 52 Wochen pro Jahr, ergibt sich ein durchschnittlicher Stundenlohn von 8,65 €. Es erfolgte eine Berechnung dieses Stundenlohnes mit dem arithmetischen Mittelwert der benötigten Arbeitszeit und den Kosten für die verwendeten Materialien (Tabelle 8).

Tabelle 7: Kosten pro gefärbten Objektträger in aufsteigender Reihenfolge der Gesamtkosten in Euro (€) pro gefärbten Objektträger

| Färbemethode | Verbrauchsmaterial | Materialkosten pro gefärbten Objektträger Einzelaufstellung | Gesamt- kosten pro gefärbten Objektträger |
|-----------------------------|---|--|--|
| Formolcitrat- Bengalrosa | 0,3 ml Formolcitrat- bengalrosalösung 1 Objektträger 1 Deckglas 2 Pipettenspitzen | 0,02 € 0,07 € 0,02 € 0,04 € | 0,15 € |
| Methyl-Violett | 1 Tropfen (0,05 ml) Methyl-Violett | 0,08 € | 0,17 € |

Ergebnisse

| | | | |
|----------------|--|--------------------------------------|--------------|
| | 1 Objektträger 1 Pipettenspitze | 0,07 € 0,02 € | |
| Eosin | 0,1 ml Eosinlösung 2 Objektträger 2 Pipettenspitzen | 0,01 € 0,14 € 0,04 € | 0,19 € |
| Eosin-Nigrosin | 0,1 ml Eosin-Nigrosin- lösung 2 Objektträger 2 Pipettenspitzen 1 Tropfen (0,05 ml) Immersionsöl | 0,01 € 0,14 € 0,04 € 0,01 € | 0,20 € |
| Hemacolor® | 3 x 0,5 – 2 ml Hemacolor®-Färbelösung 2 Objektträger 1 Pipettenspitze | 0,3 – 1,20 € 0,14 € 0,02 € | 0,46– 1,36 € |
| Sangodiff G® | 1 Sangodiff-G®-Färbe- folie und Fixierlösung 2 Objektträger 1 Pipettenspitze | 0,67 € 0,14 € 0,02 € | 0,83 € |
| Spermac® | 4 x 0,25 ml Spermac®- Färbelösung 2 Objektträger 1 Pipettenspitze | 0,74 € 0,14 € 0,02 € | 0,90 € |
| Diff-Quick® | 3 x 1,66 ml Diff-Quick®- Färbelösung 2 Objektträger 1 Pipettenspitze | 1,06 € 0,14 € 0,02 € | 1,22 € |
| Testsimplets® | 1 vorgefärbten Testsimplet®- Objektträger mit Deckglas 1 Pipettenspitze, 1 Tropfen (0,05 ml) Immersionsöl | 1,67 € 0,02 € 0,01 € | 1,70 € |

Ergebnisse

Tabelle 8: Kosten pro gefärbten Objektträger in Euro (€) unter Berücksichtigung der Materialkosten und der Vergütung der Arbeitszeit der auswertenden Tiermedizinischen Fachangestellten in aufsteigender Reihenfolge

| Färbemethode | Kosten in Euro (€) pro gefärbten Objektträger |
|-------------------------|---|
| Eosin | 1,37 € (+ 0,60 € Vitalität) |
| Eosin-Nigrosin | 1,70 € (+ 0,72 € Vitalität) |
| Hemacolor® | 2,01 – 3,10 € |
| Diff-Quick® | 2,77 € |
| Sangodiff G® | 3,66 € |
| Spermac® | 3,72 € |
| Formolcitrat-Bengalrosa | 7,68 € |
| Methyl-Violett | 9,60 € |
| Testsimplerts® | 11,46 € |

4.3 Auswertung der einzelnen Färbemethoden

Für den Vergleich der Eigenschaften der unterschiedlichen Methoden zur Färbung von porcinen Samenzellen wurde das Ejakulat von 12 Ebern auf drei verschiedene Arten (6°C, 17-18°C, 38°C) aufbewahrt, mit 9 Färbemethoden gefärbt und zum Zeitpunkt 1 (sofort), 2 (nach einem Tag), 3 (nach einer Woche) und 4 (nach drei Monaten) ausgewertet. Es handelt sich um die Analyse von 36 Präparaten und 144 Auswertungsvorgängen pro Färbemethode. Färbungsübergreifend wurden an insgesamt 324 Präparaten 1296 Auswertungsvorgänge durchgeführt. Die Ergebnisse der Beurteilung der verschiedenen Färbemethoden zum Zeitpunkt 1 sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Ergebnisse

Tabelle 9: Beurteilung der verschiedenen Färbemethoden zum Zeitpunkt 1 (sofort)

| Färbemethode | Farbintensität | Detailerkennbarkeit | Kontrast |
|-------------------------|----------------|---------------------|----------|
| Eosin | mäßig | gut | gut |
| Eosin-Nigrosin | mäßig | deutlich | deutlich |
| Hemacolor® | blass | mäßig | gut |
| Diff-Quick® | blass | mäßig | gut |
| Sangodiff-G® | blass | mäßig | schlecht |
| Spermac® | gut | gut | gut |
| Formolcitrat-Bengalrosa | intensiv | deutlich | deutlich |
| Testsimplets® | gut | gut | mäßig |
| Methyl-Violett | blass | schlecht | schlecht |

Die Färbemethoden Eosin, Eosin-Nigrosin, Hemacolor®, Diff-Quick® und Spermac® sind unabhängig von der Aufbewahrungstemperatur zu allen vier Zeitpunkten zu 100 % (36 Auswertungen pro Färbung) auswertbar. In Tabelle 10 ist die Auswertbarkeit der eingeschränkt auswertbaren Färbungen Sangodiff-G®, Formolcitrat-Bengalrosa, Testsimplets®-und Methyl-Violett dargestellt.

Tabelle 10: Auswertbarkeit der Proben der Sangodiff-G®, Testsimplets® und Methyl-Violett über die verschiedenen Aufbewahrungstemperaturen hinweg zu den unterschiedlichen Auswertungszeitpunkten (1 = sofort, 2 = nach einem Tag, 3 = nach einer Woche, 4 = nach drei Monaten)

| Färbemethode | Auswertungszeitpunkt | | | |
|-------------------------|----------------------|--------------|--------------|--------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Sangodiff-G® | 100 % (36) | 100 % (36) | 91,67 % (33) | 55,56 % (20) |
| Formolcitrat-Bengalrosa | 100 % (36) | 100 % (36) | 100 % (36) | 94,44 % (34) |
| Testsimplets® | 100 % (36) | 97,22 % (35) | 72,22 % (26) | 11,11 % (4) |
| Methyl-Violett | 100% (36) | 100 % (36) | 0 % (0) | 0 % (0) |

Ergebnisse

Darüber hinaus wurden die Ergebnisse der pathomorphologischen Untersuchung bei den verschiedenen Färbemethoden außer Methyl-Violett übergreifend über die Lagerungstemperatur zum Zeitpunkt 1 (sofort) miteinander verglichen (Tabelle 11). Bei der Integration der Färbung Methyl-Violett in diese Auswertung konnten auf Grund der extrem abweichenden Werte keine zuverlässigen Ergebnisse, besonders bezüglich der statistischen Signifikanz, erzielt werden.

Tabelle 11: Vergleich der Ergebnisse der pathomorphologischen Untersuchung mit Bestimmung des Mittelwertes (%) bei jeder einzelnen Färbemethode des Gesamtdurchschnittes (Ø) und der statistischen Signifikanz (p) über die Aufbewahrungstemperaturen hinweg zum Zeitpunkt 1 (sofort)

| Kriterium | E | EN | DQ | H | SG | S | FB | TS | Ø | p-Wert |
|-----------------------------|-------------|----------|-------------|----------|--------------|-------------|--------------|--------------|-------|-------------------|
| Spermien mit morph. Ab- | 26,53 | 26,44 | 22,56 | 22 | 18,31 | 30,5 | 26,58 | 31,81 | 25,59 | <0,0001 |
| Kopf unregelmäßig | 0,36 | 0,58 | 0,47 | 0,47 | 0,53 | 0,72 | 0,47 | 0,53 | 0,52 | 0,721 |
| Kopf rund | 0,53 | 0,33 | 0,36 | 0,36 | 0,39 | 0,5 | 0,44 | 0,39 | 0,41 | 0,926 |
| Kopf lanzenförmig | 0,06 | 0,03 | 0,03 | 0 | 0 | 0 | 7,97 | 3,86 | 1,49 | <0,0001 |
| Kopf birnenförmig | 0 | 0,06 | 0 | 0,06 | 0 | 0 | 0,03 | 0,22 | 0,05 | 0,004 |
| Doppelkopf | 0 | 0,03 | 0 | 0,14 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0 | 0,03 | 0,0353 |
| Akrosom groß/klein | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,03 | 0,00 | 0 |
| Akrosom nicht vorhanden | 0,11 | 0 | 0 | 0 | 1,19 | 1,14 | 0 | 0,17 | 0,33 | <0,0001 |
| Akrosom in Ablösung | 4,53 | 2,22 | 1,22 | 1,25 | 0,53 | 6,31 | 1,5 | 0,44 | 2,25 | <0,0001 |
| Akrosom mit Vakuolen | 0 | 0,06 | 0,03 | 0 | 0 | 0,19 | 0,08 | 0 | 0,05 | 0,0007 |
| Summe Kopf/Akrosom | 5,53 | 3,31 | 2,11 | 2,28 | 2,67 | 8,89 | 10,53 | 5,64 | 5,12 | <0,0001 |
| Mittelstück asymmetrisch | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | * |
| Mittelstück gebrochen | 1,69 | 0,5 | 1,53 | 0,78 | 1,06 | 1,42 | 0,28 | 0,31 | 0,95 | 0,0009 |
| Mittelstück verdickt/schmal | 0,08 | 0 | 0,14 | 0 | 0 | 0 | 0,14 | 0,03 | 0,05 | 0,468 |

Ergebnisse

| | | | | | | | | | | |
|---------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------|--------------|-------|-------------------|
| Summe Mittelstück | 1,78 | 0,5 | 1,67 | 0,78 | 1,06 | 1,42 | 0,42 | 0,33 | 1 | 0,0009 |
| Hauptstück schleifen | 7,17 | 7,56 | 6,92 | 9,42 | 7,39 | 8,61 | 8,28 | 10,22 | 8,2 | 0,0014 |
| Hauptstück gerollt | 0,86 | 0,36 | 0,92 | 0,53 | 0,92 | 0,75 | 1,25 | 0,86 | 0,81 | 0,0888 |
| Hauptstück geknickt | 1,92 | 1,33 | 3,94 | 3,06 | 2,11 | 1,25 | 1,03 | 1 | 1,96 | <0,0001 |
| Hauptstück gebrochen | 0,78 | 0,56 | 0,28 | 0,39 | 0,53 | 1,22 | 0,44 | 0,19 | 0,55 | 0,0002 |
| Summe Hauptstück | 10,72 | 9,81 | 12,06 | 13,39 | 10,94 | 11,83 | 11 | 12,28 | 11,50 | 0,119 |
| Plasmatropfen Hals | 1,47 | 6,72 | 1,11 | 0,81 | 0,97 | 3,22 | 1,31 | 7,5 | 2,89 | <0,0001 |
| Plasmatropfen Mittelstück | 3,08 | 3,47 | 1,83 | 1,56 | 1,08 | 2,06 | 1,75 | 4,97 | 2,48 | <0,0001 |
| Plasmatropfen Hauptstück | 0,06 | 0,14 | 0,03 | 0 | 0,03 | 0 | 0 | 0 | 0,03 | 0,002 |
| Summe Plasmatropfen | 4,61 | 10,33 | 2,9 | 2,36 | 2,08 | 5,28 | 3,06 | 12,47 | 5,39 | <0,0001 |
| Einzelne Köpfe | 3,83 | 2,5 | 3,75 | 3,19 | 1,56 | 3,08 | 1,58 | 1,08 | 2,57 | <0,0001 |

4.3.1 Eosin

Zu den ersten drei Zeitpunkten hatten alle 36 mit der Eosin-Färbung gefärbten Präparate eine mäßige Farbintensität, eine gute Detailerkennbarkeit, einen guten Kontrast und einen klaren Hintergrund.

Zum Zeitpunkt 2 traten bei 3 von 12 Ebern (30 %) und zum Zeitpunkt 4 bei 5 von 12 Ebern (41,67 %) Farbkristallanlagerungen an den Spermien oder große Farbkristalle im ganzen Präparat auf, so dass die Auswertung der Pathomorphologie besonders das Erkennen von Plasmotropfen deutlich erschwert wurde (Abbildung 12, 13). Nach drei Monaten (Zeitpunkt 4) stellte sich die Eosin-Färbung in allen 36 Präparaten blasser und mit mäßiger Schärfe dar. In einzelnen Präparaten konnten zum Zeitpunkt 4 vermehrt Spermien mit weißem Randsaum bzw. rotem Hof um den weißen, sie umgebenden Saum, festgestellt werden, was als Artefaktbildung zu werten ist. Die pathomorphologische Untersuchung von mit Eosin-gefärbten Präparaten zeigt grundsätzlich einen leicht erhöhten Anteil Spermien mit morphologischen Abweichungen mit 26,53 % im Verhältnis zum arithmetischen Mittelwert der Färbungen von 25,59 %. Der Grund dafür ist ein hoher Anteil Spermien mit einem sich in Ablösung befindlichen Akrosom mit 4,53 % (arithmetischer Mittelwert 2,25 %) und ein auffällig erhöhter Anteil Samenzellen mit gebrochenen Mittelstücken mit 1,69 % (arithmetischer Mittelwert 0,95 %). Darüber hinaus treten bei dieser Färbung die meisten einzeln gelagerten Köpfe mit 3,83 % (arithmetischer Mittelwert 2,57 %) auf.



Abbildung 12: Eosin-Färbung, flüssigkonserviertes Ebersperma, 400fache Vergrößerung, Farbkristalle zum Zeitpunkt 2 (nach einem Tag)

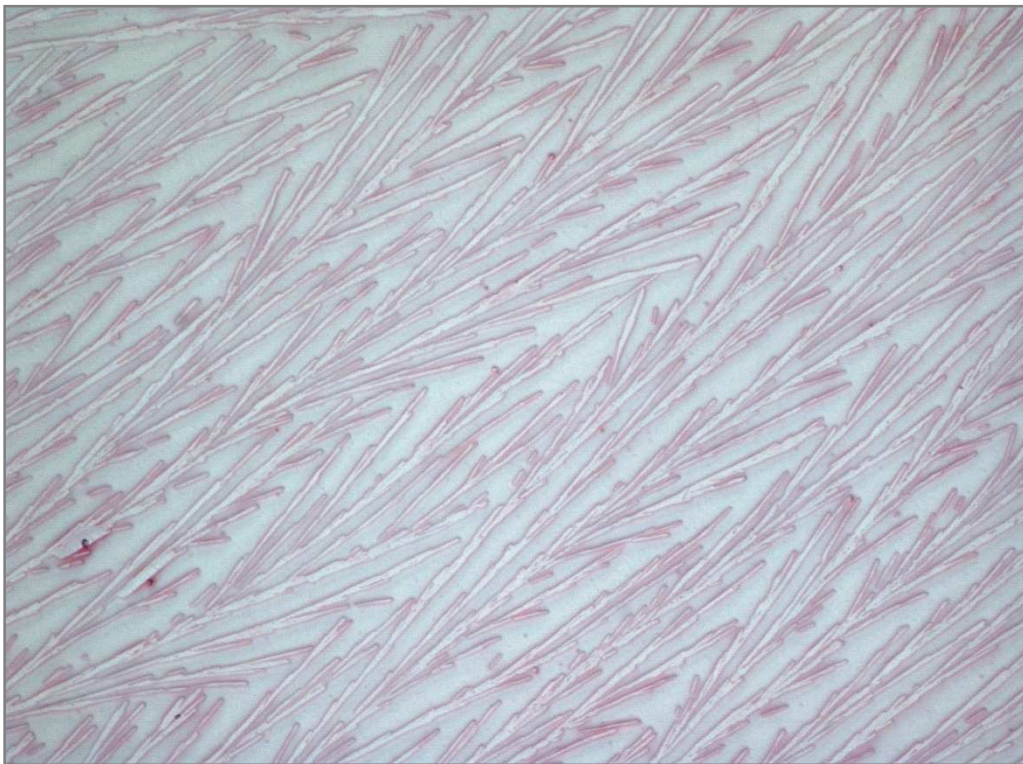


Abbildung 13: Eosin-Färbung, flüssigkonserviertes Ebersperma, 400fache Vergrößerung, Farbkristalle zum Zeitpunkt 2 (nach einem Tag)

4.3.2 Eosin-Nigrosin

Zu allen Zeitpunkten wiesen alle 36 mit Eosin-Nigrosin gefärbten Präparate eine mäßige Farbintensität, eine deutliche Detailerkennbarkeit, einen deutlichen Kontrast und einen klaren Hintergrund auf.

Zum Zeitpunkt 2 und 4 traten bei 2 von 12 Ebern (16,67 %) große Farbkristalle auf (Abbildung 14). Bei 6 von 12 Ebern (50 %) konnten zum Zeitpunkt 4 im homogen gräulichen Hintergrund einzelne, meist annähernd parallel verlaufende, weiße Streifen nachgewiesen werden (Abbildung 15). Am Rande dieser klar abgegrenzten, streifenförmigen, hellen Bereiche befanden sich beschädigte Samenzellen. Die Pathomorphologie und besonders Cytoplasmotropfen sind in der 1000fachen Vergrößerung gut zu erkennen. Bei der pathomorphologischen Untersuchung von mit Eosin-Nigrosin-gefärbten Präparaten zeigt ebenso wie Eosin eine leicht erhöhten Anteil morphologisch abweichender Samenzellen mit 26,44 % im Vergleich zum arithmetischen Mittelwert von 25,59 %. Zusätzlich fallen eine hohe Anzahl Plasmotropfen mit 10,33 % (arithmetischer Mittelwert 5,39 %) auf.

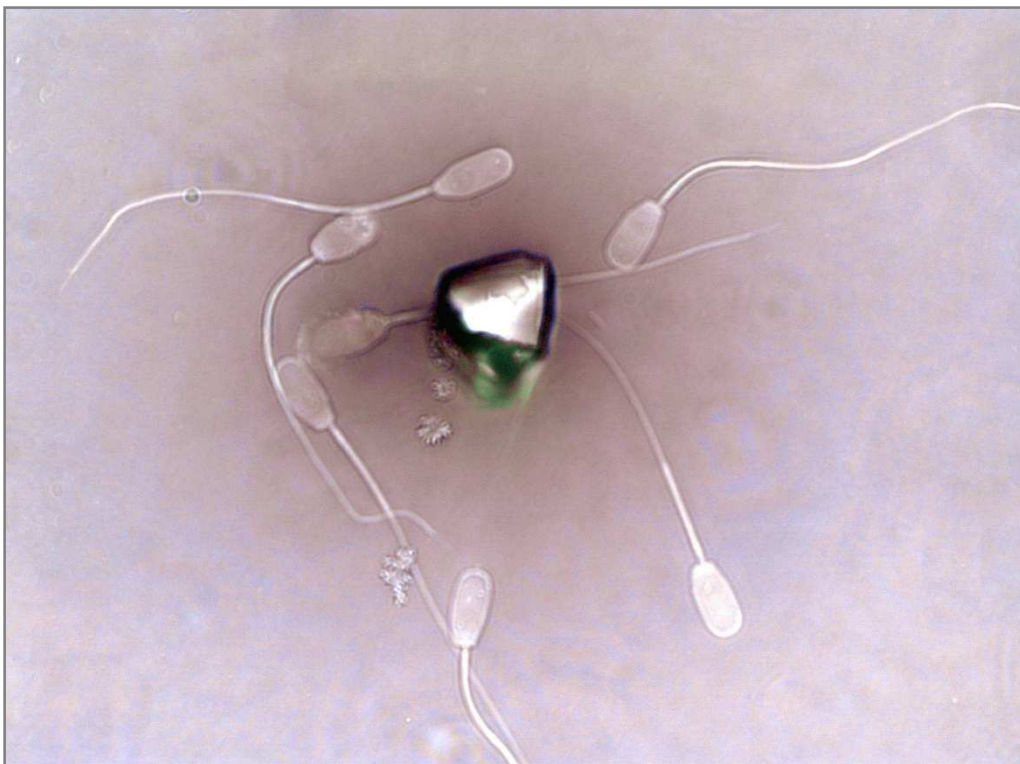


Abbildung 14: Eosin-Nigrosin-Färbung, flüssigkonserviertes Ebersperma, 1000fache Vergrößerung mit Immersionsöl, Farbkristallbildung



Abbildung 15: Eosin-Nigrosin-Färbung, flüssigkonserviertes Ebersperma, 1000fache Vergrößerung mit Immersionsöl, links und rechts im Bild Streifenbildung zum Zeitpunkt 4 (nach drei Monaten)

4.3.3 Diff-Quick®

Die Diff-Quick®-Färbung stellte sich in allen 36 Objektträgern mit blasser Farbintensität dar. Die Detaillierkennbarkeit ist mäßig, der Kontrast gut und der Hintergrund klar.

Zum Zeitpunkt 4 stellten sich alle Präparate noch blasser dar und sind bei 2 von 12 Ebern (16,67 %) auf Grund mangelnder Farbe und kaum Kontrast nur noch schwierig auswertbar (Abbildung 16). Hier wurden auf einzelnen Objektträgern (je 8,33 %) Bereiche mit entfärbten, gelblichen Samenzellen, farbigen Partikeln an den Samenzellen und gezackten Schwänzen nachgewiesen. Die pathomorphologische Untersuchung von mit Diff-Quick®-gefärbten Präparaten sticht im Gegensatz zu Eosin und Eosin-Nigrosin durch einen erniedrigten Anteil von 22,56 % morphologisch veränderter Samenzellen im Vergleich zum Mittelwert von 25,59 % heraus. Zuerst fällt ein geringer Anteil Kopf- und Akrosomveränderungen mit 2,11 % im Vergleich zu durchschnittlich 5,12 % auf. Der Anteil an Mittelstückveränderungen ist mit 1,67 % (arithmetischer Mittelwert

1,0) und geknickte Hauptstücke mit 3,94 % (arithmetischer Mittelwert 1,96 %) hingegen erhöht. Schleifenförmige Hauptstücke und Plasmotropfen sind mit 6,92 % (arithmetischer Mittelwert 8,2 %) bzw. 2,9 % (arithmetischer Mittelwert 5,39 %) seltener als im Durchschnitt zu finden.



Abbildung 16: Diff-Quick®-Färbung, flüssigkonserviertes Ebersperma, 400fache Vergrößerung, blasses Präparat mit Farbpartikeln zum Zeitpunkt 4 (nach 3 Monaten)

4.3.4 Hemacolor®

Die Hemacolor®-Färbung konnte in allen 36 Präparaten zu den ersten drei Zeitpunkten mit einer blassen Farbintensität, mäßiger Detailerkennbarkeit und gutem Kontrast beurteilt werden. Die Farbintensität fällt im Vergleich zur Diff-Quick®-Färbung geringer aus. Der Unterschied ist jedoch so gering, dass es nicht zu einer unterschiedlichen Bewertung kam.

Zum Zeitpunkt 4 stellten sich alle Präparate noch blasser dar und sind bei 2 von 12 Ebern (16,67 %) auf Grund mangelnder Farbe und Kontrast nur noch bedingt auswertbar. Bei 4 von 12 Ebern (33,33 %) können zum Zeitpunkt 4 farbige Partikel an den Spermien nachgewiesen werden (Abbildung 17), die die

Auswertung erschwerte. Komplette entfärbte gelbliche Bereiche auf den Objektträgern traten bei 2 von 12 Ebern (16,67 %) zum Zeitpunkt 4 auf. Bei einzelnen Präparaten konnten vermehrt Samenzellen mit gezackten Schwänzen beobachtet werden. Der Anteil morphologisch abweichender Samenzellen liegt bei mit Hemacolor®-gefärbten Präparaten mit 22,0 % ebenso wie mit Diff-Quick® deutlich unter dem Mittelwert von 25,59 %. Dieser geringe Wert ergibt sich aus einem niedrigen Anteil Kopf- und Akrosomveränderungen mit 2,28 % (arithmetischer Mittelwert 5,12 %) und einen niedrigen Anteil Plasmotropfen mit 2,36 % (arithmetischer Mittelwert 5,39 %).



Abbildung 17: Hemacolor-Färbung, flüssigkonserviertes Ebersperma, 400fache Vergrößerung, zahlreiche Farbpartikel an und um die Samenzellen

4.3.5 Sangodiff-G®

Zu allen vier Zeitpunkten wiesen 36 mit Sangodiff-G®-gefärbte Präparate eine blasse Farbe, mäßige Detailerkennbarkeit und einen schlechten Kontrast auf.

Bei 6 von 12 Ebern (50 %) liegen die Samenzellen in großen Bereichen des Objektträgers auf einem körnigen Hintergrund, der die Auswertung der

Ergebnisse

Morphologie der einzelnen Samenzelle deutlich erschwert (Abbildung 18). Fleckig angefärbte Kopfkappen treten bei 3 von 12 Ebern (25 %) auf. Die gefärbten Samenzellen von zwei weiteren Ebern (16,67 %) weisen Anlagerungen farbiger Partikel auf, die ebenso die Auswertung der Morphologie beeinträchtigen. Nach drei Monaten haben einige Präparate so viel Farbe verloren, dass die Beurteilung nicht mehr erfolgen kann und somit zum Zeitpunkt 3 nur 91,67 % (33) und zum Zeitpunkt 4 nur noch 55,56 % (20) der Präparate auswertbar sind. Mit Sangodiff-G®-gefärbte Präparate haben durchschnittlich den niedrigsten Anteil an morphologisch abweichenden Samenzellen mit 18,31 %. Zusätzliche fallen ein geringer Anteil Kopf- und Akrosomveränderungen mit 2,67 % und der niedrigste Gesamtanteil an Samenzellen mit Plasmotropfen mit nur 2,08 % (arithmetischer Mittelwert 5,39 %).



Abbildung 18: Sangodiff-G-Färbung, flüssigkonserviertes Ebersperma, 400fache Vergrößerung, Streifen mit körnigen Farbresten überlagern teilweise die Samenzellen

4.3.6 Spermac®

Die Spermac®-Färbung konnte in 33 von 36 Präparaten (91,67 %) zu allen vier Zeitpunkten mit einer guten Farbintensität, guter Schärfe und einem guten Kontrast beurteilt werden.

Bei 4 von 12 Ebern (33,33 %) zeigte sich zum Zeitpunkt 4 ein Verblasen der Farbintensität (Abbildung 19). In einigen Fällen (16,67%) traten auch bei dieser Färbung vermehrt Farbpartikelanlagerungen am Spermischwanz auf, was die Untersuchung auf Cytoplasmatropfen erschwert. Der Anteil detektierter Plasmotropfen wich mit 5,28 % allerdings kaum vom Mittelwert der Färbemethoden ab (5,39 %). 2 von 12 Ebern (16,67 %) fielen durch vermehrt undeutlich fleckige Spermienköpfe und –kopfkappen auf. Bei einem Eber (8,33 %) waren die gefärbten Präparate zum Zeitpunkt 4 unscharf und nur schwer auswertbar. Bei der Färbung mit Spermac® zeigten sich in der pathomorphologischen Untersuchung 30,5 % morphologisch abweichenden Spermien. Dieser erhöhte Wert setzt sich aus einem herausragend hohen Anteil Akrosomveränderungen mit 1,14 % nicht vorhandenen Akrosomen (arithmetischer Mittelwert 0,33 %), 6,31 % Akrosomen in Ablösung (arithmetischer Mittelwert 2,25 %) und 0,19 % Akrosomen mit Vakuolen (arithmetischer Mittelwert 0,05 %) zusammen. Darüber hinaus werden in mit Spermac®-gefärbten Präparaten durchschnittlich die meisten gebrochenen Hauptstücke mit 1,22 % erkannt.

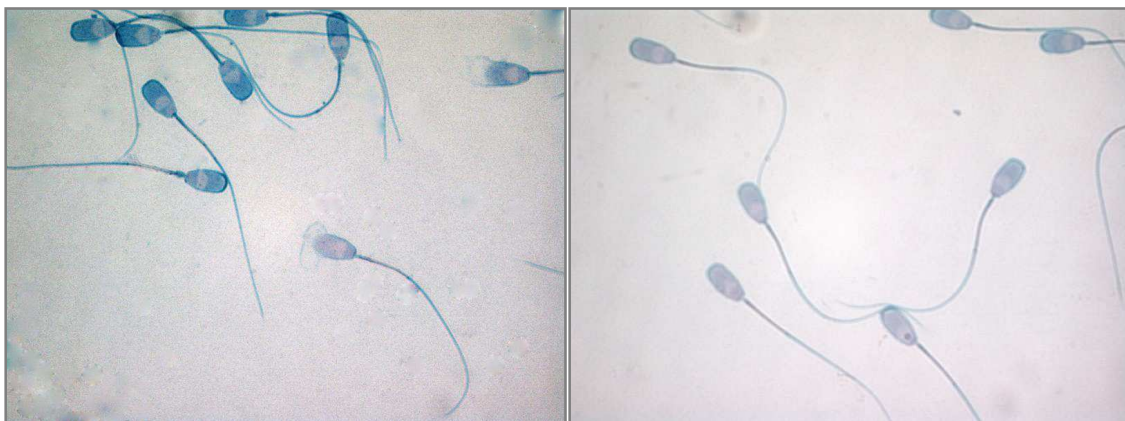


Abbildung 19: Spermac-Färbung, flüssigkonserviertes Ebersperma, 1000fache Vergrößerung mit Immersionsöl, ursprüngliche Farbintensität zum Zeitpunkt 1 (links) und deutlich verblasste Farbintensität zum Zeitpunkt 4 (rechts)

4.3.7 Formolcitrat-Begalrosa

Zu allen Zeitpunkten zeigen mit der Formolcitrat-Bengalrosa-Färbung gefärbte Präparate eine intensive Färbung, eine deutliche Detailerkennbarkeit und einen deutlichen Kontrast und klaren Hintergrund.

Bei 6 Ebern (50 %) konnte nach einer Stunde noch keine Auswertung erfolgen, weil die Samenzellen noch nicht flach, sondern schwimmend in mehreren Ebenen lagen (Abbildung 20). Auch bei dieser Färbung konnte bei 4 von 12 Ebern (33,33 %) nach Trocknung großen Farbkristalle nachgewiesen werden, die die Auswertung deutlich erschwerten. Zum Zeitpunkt 4 fielen bei 6 Ebern (50 %) zusammengezogene Tropfen und dadurch verbogene und verzerrte Samenzellen auf. Dadurch sind nur die Spermien innerhalb und außerhalb dieser Tropfen auswertbar und nicht die beschädigten Spermien auf der Grenze (Abbildung 21). Bei 2 Präparaten konnte aus diesem Grund zum Zeitpunkt 4 keine Auswertung mehr erfolgen. Die Ergebnisse der pathomorphologischen Untersuchung liegen bei der Färbung mit Formolcitrat-Bengalrosa mit 26,58 % morphologisch abweichenden Samenzellen nahe am arithmetischen Mittelwert (25,59 %). Diese Färbung weist den größten Anteil lanzenförmiger Köpfe mit 7,97 % (arithmetischer Mittelwert 1,49 %) und dadurch bedingt auch noch den größten Anteil Kopf- und Akrosomveränderungen (10,53 %) insgesamt auf. Hinzu kommt noch der auffällig niedriger Anteil gebrochener Mittelstücke mit 0,28 % im Vergleich mit dem Mittelwert der Färbungen von 0,95 %.

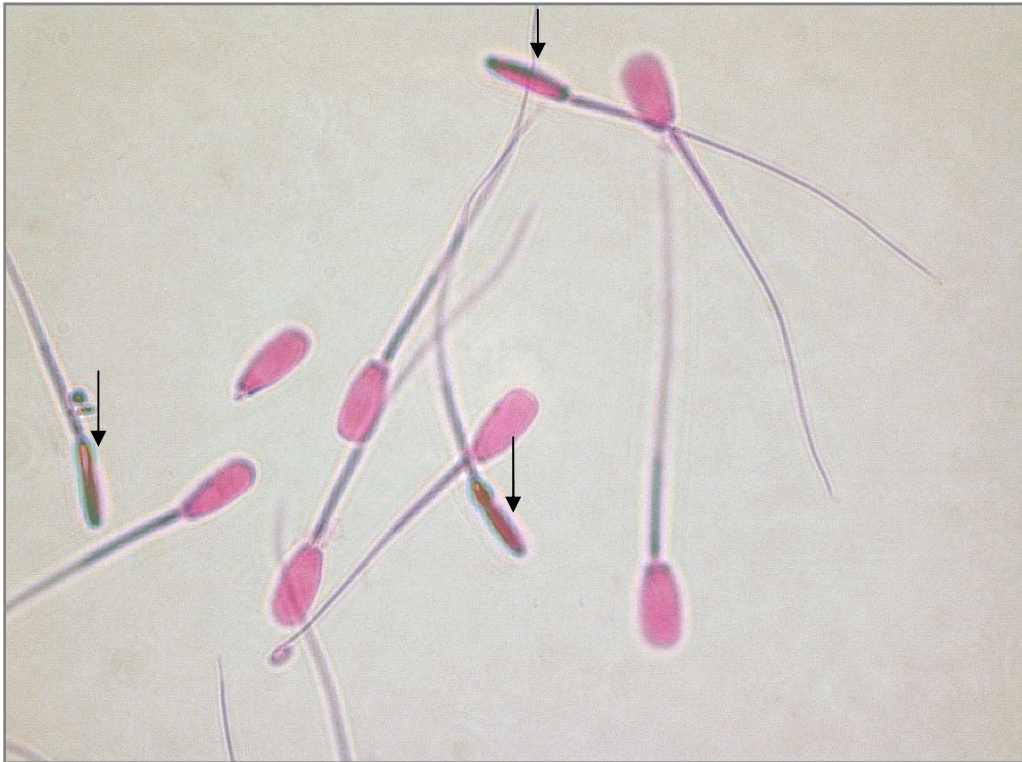


Abbildung 20: Formolcitrat-Bengalrosa-Färbung, flüssigkonserviertes Ebersperma, 1000fache Vergrößerung mit Immersionsöl, Lanzenbildung zum Zeitpunkt 1 (sofort) (Markierung)



Abbildung 21: Formolcitrat-Bengalrosa-Färbung, flüssigkonserviertes Ebersperma, 1000fache Vergrößerung mit Immersionsöl, Tropfenbildung zum Zeitpunkt 4 (nach drei Monaten)

4.3.8 Testsimplets®

Grundsätzlich wiesen die mit Testsimplets® gefärbten Präparate eine gute Farbintensität, gute Detailerkennbarkeit und einen mäßigen Kontrast auf.

Es waren bei allen gefärbten Präparaten netzartig aufgespannte Farbreste im Hintergrund der Samenzellen sichtbar. Ebenso wie bei der Formolcitrat-Bengalrosa-Färbung kam es auch bei der Testsimplets®-Färbung zu Wartezeiten von mindestens einer Stunde bis die einzelnen Samenzellen sich flach gelagert haben und keinen unterschiedlichen Flüssigkeitsebenen mehr die Auswertungen behindern. Bei 4 Ebern (33,33 %) traten zum Zeitpunkt 1 und 2 Unregelmäßigkeiten bei der Anfärbung der Kopfkappen auf. Ab einer Woche nach der Anfertigung war bei einigen Präparaten die Auswertung durch Entfärbung und zusammengezogene Farbtropfen deutlich erschwert (Abbildung 22). Zusätzlich waren die Präparate von 2 Ebern (16,67 %) zum Zeitpunkt 4 gelbstichig und unscharf (Abbildung 23). Daraus resultiert eine reduzierte

Ergebnisse

Auswertbarkeit von 97,22 % (35) nach einem Tag, von 72,22 % (26) nach einer Woche und 11,11 % (4) nach drei Monaten. In mit Testsimplets®-gefärbten Präparaten wurde mit 31,81 % der größte Anteil morphologisch veränderter Samenzellen gefunden. Es befinden sich ebenso wie bei mit Formolcitrat-Bengalrosa gefärbten Präparaten vermehrt lanzenförmige Samenzellen in den Präparaten (3,86 %). Darüber hinaus wurde der größte Anteil birnenförmiger Kopfformen mit 0,22 % (arithmetischer Mittelwert 0,05 %), schleifenförmiger Hauptstücke mit 10,22 % (arithmetischer Mittelwert 8,2 %) und Plasmotropfen mit 12,47 % (arithmetischer Mittelwert 5,39 %) dargestellt. Besonders selten zeigten sich Akrosome in Ablösung mit 0,44 % (arithmetischer Mittelwert 2,25 %), Mittelstückveränderungen mit 0,33 % (arithmetischer Mittelwert 1,0 %), geknickte Hauptstücke mit 1,0 % (arithmetischer Mittelwert 1,96 %), gebrochene Hauptstücke 0,19 % (arithmetischer Mittelwert 0,55 %) und einzelne Köpfe mit 1,08 % (arithmetischer Mittelwert 2,57 %).

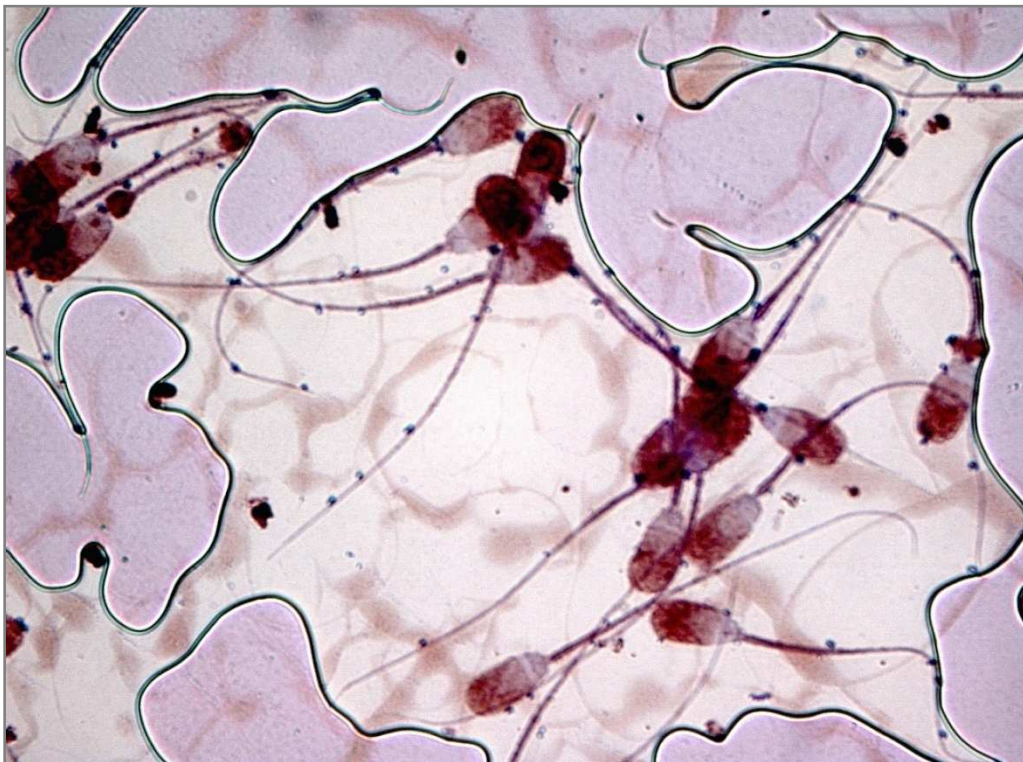


Abbildung 22: Testsimplets®, flüssigkonserviertes Ebersperma, 1000fache Vergrößerung mit Immersionsöl, Tropfenbildung zum Zeitpunkt 4 (nach drei Monaten)



Abbildung 23: Testsimplets®, flüssigkonserviertes Ebersperma, 1000fache Vergrößerung mit Immersionsöl, gelbstichig und unscharf zum Zeitpunkt 4 (nach drei Monaten)

4.3.9 Methyl-Violett

Die Methyl-Violett-Färbung konnte in allen 36 Präparaten mit einer blassen Farbintensität, schlechter Detailerkennbarkeit und schlechtem Kontrast beurteilt werden.

Bei allen 12 Ebern wurden zum Zeitpunkt 1 auch bis zu vier Stunden nach Anfertigung des Präparates noch vermehrt Lanzenbildung festgestellt. Zusätzlich lagen die Samenzellen übereinander und waren somit zu einem großen Anteil nicht auswertbar (Abbildung 24). Zum Zeitpunkt 2 war die Farbintensität der einzelnen gefärbten Samenzelle ähnlich wie bei Diff-Quick®- und Hemacolor®-Präparaten. Zusätzlich kam es bei allen Objektträgern zu starker Tropfenbildung und dadurch verzogenen, häufig in Schleifen liegenden, Samenzellen (Abbildung 25). Nach einer Woche, zum Zeitpunkt 3, lagen bei allen Präparaten die Samenzellen in mehreren Ebenen und die Tropfen waren stark zusammengezogen, so dass keine Beurteilung der einzelnen Samenzellen erfolgen konnte.

Ergebnisse

Mit Methyl-Violett-gefärbte Präparate fielen durch einen großen Anteil morphologisch abweichender Samenzellen mit durchschnittlich 74,86 % auf. Den größten Anteil dieser morphologisch abweichenden Samenzellen machen mit 71,33 % noch lanzenförmig gelagerte Köpfe nach der angegebenen Wartezeit von 10 Minuten aus. Auf eine vergleichende Untersuchung der Pathomorphologie wurde verzichtet, weil auf Grund der Rohdaten bereits offensichtlich war, dass eine starke färbungsbedingte Artefaktbildung vorliegt und durch diese Färbung die statistische Signifikanz aller Abweichungen bei den anderen Färbungen beeinträchtigt werden würde.

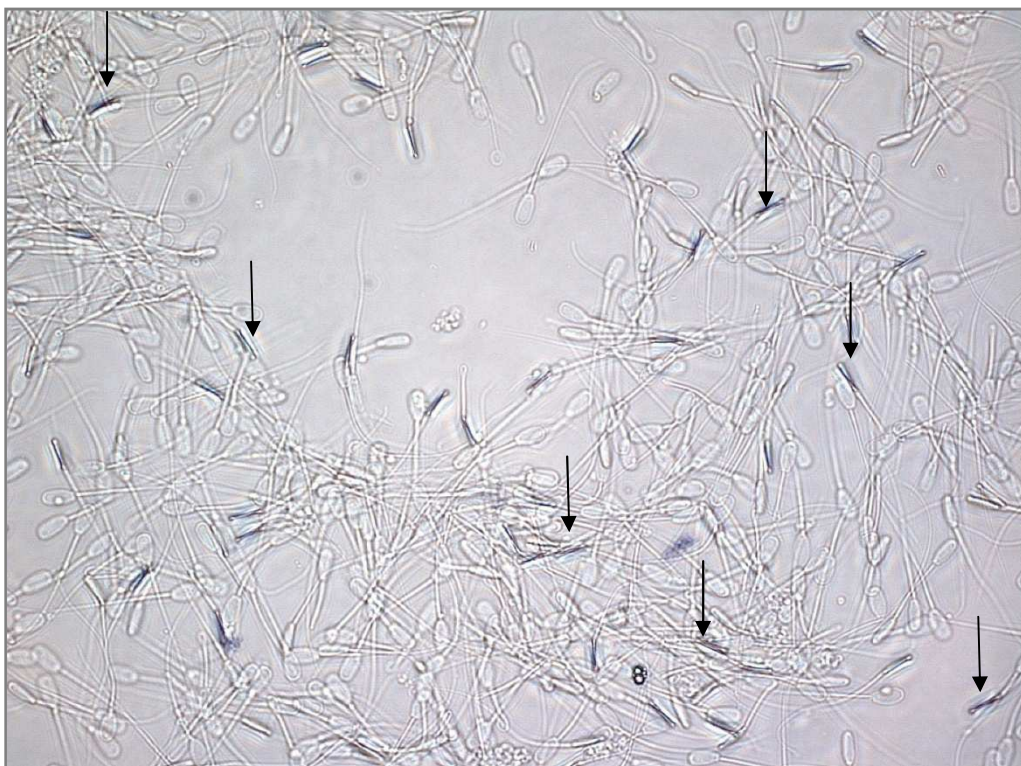


Abbildung 24: Methyl-Violett®, flüssigkonserviertes Ebersperma, 400fache Vergrößerung, Lanzenbildung zum Zeitpunkt 1 (sofort) (Markierung)



Abbildung 25: Methyl-Violett, flüssigkonserviertes Ebersperma, 400fache Vergrößerung, Tropfenbildung zum Zeitpunkt 2 (nach einem Tag)

4.4 Vergleich der Lebend-Tot-Beurteilung

Zur Bestimmung der Anzahl der lebenden bzw. toten Spermien in einem Ejakulat eignen sich nur zwei der neun durchgeführten Färbungen.

Von jeder der beiden Färbungen wurden 144 einzelne Präparate von 12 verschiedenen Ebern im Vergleich beurteilt. Beide Färbemethoden besitzen eine mäßige Farbtintensität. Sowohl die Detailerkennbarkeit als auch der Kontrast wurde bei der Eosin-Nigrosin Färbung etwas besser mit „deutlich“ und bei Eosin lediglich mit „gut“ bewertet. Der Kopf der toten Samenzellen ist entsprechend der bedeutend größeren Farbstoffmenge bei mit Eosin gefärbten Präparaten deutlich dunkler rot angefärbt als bei mit Eosin-Nigrosin gefärbten Präparaten. In allen beurteilten Präparaten konnte allerdings kein farblicher Unterschied zwischen den beiden unterschiedlichen Eosin-Farbstoffen (Eosin G/Eosin Y) in Richtung einer bläulichen oder gelblichen Betonung des roten Farbstoffes festgestellt werden. Die Eosin-Färbung wird in der 400fachen Vergrößerung ohne Öl beurteilt und die Eosin-Nigrosin-Färbung in der

1000fachen Vergrößerung mit Öl. Durch die Beurteilung in der 1000fachen Vergrößerung mit Öl und dem deutlich dunkler gefärbten Hintergrund ist die Unterscheidung der lebenden von den toten Spermien in der Eosin-Nigrosin-Färbung trotz der weniger intensiven Rotfärbung einfacher und prägnanter. Da in der 1000fachen Vergrößerung in einem Sichtfeld weniger Spermien beurteilt werden können, verlängert sich allerdings die Arbeitszeit um ungefähr 50 Sekunden von $\bar{0} 4 \text{ min } 8,83 \pm 11,65 \text{ s}$ bei der Beurteilung von mit Eosin gefärbten Präparaten auf $\bar{0} 4 \text{ min } 58,33 \pm 7,99 \text{ s}$ bei der Beurteilung von mit Eosin-Nigrosin gefärbten Präparaten. Um die Absolutwerte der Vitalitätsbestimmung der beiden Färbemethoden vergleichen zu können, wurde, nachdem bei den 144 beurteilten Präparaten die Anzahl der lebenden und toten Samenzellen feststand, die Differenz zwischen dem prozentualen Anteil den als lebend beurteilten Spermien in der Eosin-Färbung und den als lebend beurteilten Spermien in der Eosin-Nigrosin-Färbung erfasst. Der arithmetische Mittelwert der Differenz zwischen den als vital beurteilten Samenzellen in der Eosin- und in der Eosin-Nigrosin-Färbung beträgt 4,99 %, d. h. in der Eosin-Nigrosin-Färbung werden durchschnittlich 4,99 % weniger Samenzellen als tot beurteilt als in der Eosin-Färbung ($\bar{0} 4,99 \pm 13,94 \text{ %}$). Da der arithmetische Mittelwert sehr empfindlich gegenüber Extremwerten ist, wurde auch der Median 2, Zentralwert, anhand einer sortierten Urliste bestimmt. Die Spannweite liegt auf Grund der Extremwerte +50 und -33,5 bei 83,5 %. Die bildliche Gegenüberstellung der beiden Färbungen ist in Abbildung 26 dargestellt und die einzelnen Ergebnisse mit der errechneten Differenz der Vitalität zwischen den beiden Färbungen befinden sich im Anhang Tabelle 12.

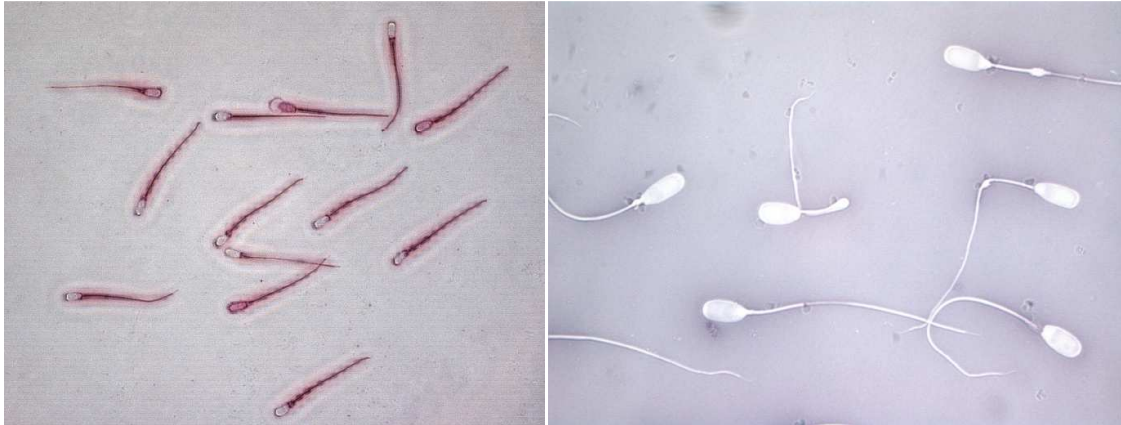


Abbildung 26: Eosin-Färbung (links) in 400facher Vergrößerung und Eosin-Nigrosin-Färbung (rechts) in 1000facher Vergrößerung mit Öl, flüssigkonserviertes Ebersperma

4.5 Einfluss der Art der Lagerung des Spermas vor der Färbung auf die Auswertung

Um den Einfluss der Aufbewahrungstemperatur des Spermas (6°C, 18°C, 38°C) vor der Färbung auf die Auswertung beurteilen zu können, wurden die Mittelwerte der einzelnen pathomorphologischen Merkmale miteinander verglichen. In Tabelle 14 werden die Mittelwerte der Bewertungspunkte aller neun Färbungen und die Statistische Relevanz der Abweichungen dargestellt. Die Mittelwerte der Bewertungspunkte „unregelmäßige Kopfform“, „birnenförmige Kopfform“, „Doppelkopf“, „große/kleines Akrosom“, „aufgerolltes Hauptstück“ und „Plasmotropfen Hauptstück“ sind sehr niedrig (< 5%) und es bestehen im Verhältnis zu diese kleinen Werten große Abweichungen zwischen den unterschiedlichen Temperaturen. Damit weisen sie als einzige Bewertungspunkte einen statistisch signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) auf. Wenn bei keiner der drei untersuchten Temperaturen Veränderungen aufgetreten sind, wie zum Beispiel bei asymmetrischen Ausprägungen des Mittelstückes, besitzt dieses Merkmal nur die Ausprägung „0“ und es kann keine statistische Signifikanz beurteilt werden ($p = *$). Wenn die Signifikanz mit „0“ oder „E“ beurteilt wird, stellt dies keinen statistisch signifikanten Unterschied dar, sondern ist ein Konvergenz-Fehler auf Grund zu selten gezählter Ereignisse im Zusammenspiel mit zu kleinen Fallzahlen. Es konnte in diesen

Ergebnisse

Fällen keine statistische Auswertung mit dem ansonsten vorliegenden geplanten Verfahren durchgeführt werden.

Die gleiche Auswertung erfolgte für jede einzelne Färbemethode und wird in Tabelle 15 bis 23 dargestellt.

Die Beurteilung der Vitalität der porcinen Samenzellen der unterschiedlich gelagerten Portionen ergab die in Tabelle 13 dargestellten Ergebnisse.

Tabelle 13: Mittelwerte der Vitalität (vital/nicht vital in %) von mit Eosin und Eosin-Nigrosin-gefärbter Präparate bei unterschiedlichen Aufbewahrungstemperaturen über alle Untersuchungszeitpunkte hinweg

| Aufbewahrungstemperatur | Eosin | Eosin-Nigrosin |
|-------------------------|---------------|----------------|
| 18°C | 80,00 / 20,00 | 87,28 / 12,72 |
| 38°C | 70,68 / 29,32 | 79,27 / 20,73 |
| 6°C | 84,97 / 15,03 | 84,36 / 15,64 |

Ergebnisse

Tabelle 14: Mittelwerte der einzelnen pathomorphologischen Merkmale (%) über die verschiedenen Färbemethoden hinweg bei den unterschiedlichen Aufbewahrungstemperaturen und die statistische Relevanz der Abweichungen (p-Wert) zum Auswertungszeitpunkt 1

| Kriterium | Temperatur | | | |
|---|------------|-------|-------|-------------------|
| | 18°C | 38°C | 6°C | p-Wert |
| Spermien mit morphologischen Abweichungen | 30,59 | 31,34 | 31,26 | 0,908 |
| Kopf unregelmäßig | 0,48 | 0,33 | 0,56 | 0,047 |
| Kopf rund | 0,38 | 0,41 | 0,32 | 0,626 |
| Kopf lanzenförmig | 9,91 | 8,9 | 8,95 | 0,526 |
| Kopf birnenförmig | 0,02 | 0,02 | 0,08 | <0,0001 |
| Doppelkopf | 0,05 | 0,01 | 0,03 | 0,0238 |
| Akrosom groß/klein | 0 | 0 | 0,01 | 0 |
| Akrosom nicht vorhanden | 0,34 | 0,25 | 0,28 | 0,29 |
| Akrosom in Ablösung | 2,06 | 2,21 | 1,73 | 0,18 |
| Akrosom mit Vakuolen | 0 | 0,06 | 0,06 | 0,814 |
| Summe Kopf/Akrosom | 13,23 | 12,19 | 12,03 | 0,548 |
| Mittelstück asymmetrisch | 0 | 0 | 0 | * |
| Mittelstück gebrochen | 1,05 | 76 | 0,93 | 0,467 |
| Mittelstück verdickt/schmal | 0,06 | 0,02 | 0,06 | 0,0519 |
| Summe Mittelstück | 1,1 | 0,78 | 0,98 | 0,398 |
| Hauptstück schleifenförmig | 6,78 | 7,56 | 8,11 | 0,0629 |
| Hauptstück gerollt | 0,48 | 0,83 | 0,83 | 0,0191 |
| Hauptstück geknickt | 1,83 | 1,83 | 1,8 | 0,986 |
| Hauptstück gebrochen | 0,42 | 0,64 | 0,41 | 0,0595 |
| Summe Hauptstück | 9,51 | 10,86 | 11,15 | 0,0721 |
| Plasmotropfen Hals | 2,56 | 2,67 | 2,47 | 0,842 |
| Plasmotropfen Mittelstück | 2,25 | 2,33 | 2,04 | 0,637 |
| Plasmotropfen Hauptstück | 0,05 | 0,01 | 0,03 | 0,0007 |
| Summe Plasmotropfen | 4,86 | 5,01 | 4,54 | 0,662 |
| Einzelne Köpfe | 1,89 | 2,5 | 2,56 | 0,0975 |

Ergebnisse

Tabelle 15: Mittelwerte der pathomorphologischen Merkmale (%) von mit Eosin gefärbten Präparaten bei unterschiedlichen Aufbewahrungstemperaturen und die statistische Relevanz der Abweichungen (p-Wert) zum Auswertungszeitpunkt 1 (sofort)

| Kriterium | Temperatur | | | |
|---|------------|-------|-------|-------------------|
| | 18°C | 38°C | 6°C | p-Wert |
| Spermien mit morphologischen Abweichungen | 27,42 | 28,5 | 23,67 | 0,294 |
| Kopf unregelmäßig | 0,25 | 0,42 | 0,42 | 0,272 |
| Kopf rund | 0,67 | 0,58 | 0,33 | 0,416 |
| Kopf lanzenförmig | 0 | 0,17 | 0 | 1 |
| Kopf birnenförmig | 0 | 0 | 0 | * |
| Doppelkopf | 0 | 0 | 0 | * |
| Akrosom groß/klein | 0 | 0 | 0 | * |
| Akrosom nicht vorhanden | 0 | 0,33 | 0 | 0 |
| Akrosom in Ablösung | 4,92 | 5,33 | 3,33 | 0,159 |
| Akrosom mit Vakuolen | 0 | 0 | 0 | * |
| Summe Kopf/Akrosom | 5,83 | 6,83 | 4,08 | 0,0573 |
| Mittelstück asymmetrisch | 0 | 0 | 0 | * |
| Mittelstück gebrochen | 3,08 | 1,25 | 0,75 | 0,0009 |
| Mittelstück verdickt/schmal | 0,17 | 0,08 | 0 | 0,242 |
| Summe Mittelstück | 3,25 | 1,33 | 0,75 | 0,0007 |
| Hauptstück schleifenförmig | 6,42 | 7,58 | 7,5 | 0,543 |
| Hauptstück gerollt | 0,17 | 0,25 | 1,5 | 0,0524 |
| Hauptstück geknickt | 2,33 | 1,92 | 1,5 | 0,143 |
| Hauptstück gebrochen | 0,5 | 1,25 | 0,58 | <0,0001 |
| Summe Hauptstück | 9,42 | 11,67 | 11,08 | 0,437 |
| Plasmotropfen Hals | 1,5 | 1,33 | 1,58 | 0,792 |
| Plasmotropfen Mittelstück | 3,08 | 3,42 | 2,75 | 0,653 |
| Plasmotropfen Hauptstück | 0,17 | 0 | 0 | 0 |
| Summe Plasmotropfen | 4,75 | 4,75 | 4,33 | 0,885 |
| Einzelne Köpfe | 4,17 | 3,92 | 3,42 | 0,866 |

Ergebnisse

Tabelle 16: Mittelwerte der pathomorphologischen Merkmale (%) von mit Eosin-Nigrosin gefärbten Präparaten bei unterschiedlichen Aufbewahrungstemperaturen und die statistische Relevanz der Abweichungen (p-Wert) zum Auswertungszeitpunkt 1 (sofort)

| Kriterium | Temperatur | | | |
|---|------------|-------|-------|---------------|
| | 18°C | 38°C | 6°C | p-Wert |
| Spermien mit morphologischen Abweichungen | 28,25 | 25,42 | 25,67 | 0,536 |
| Kopf unregelmäßig | 0,75 | 0,42 | 0,58 | 0,0878 |
| Kopf rund | 0,17 | 0,42 | 0,42 | 0,256 |
| Kopf lanzenförmig | 0,08 | 0 | 0 | 0 |
| Kopf birnenförmig | 0 | 0,08 | 0,08 | 0 |
| Doppelkopf | 0,08 | 0 | 0 | 0 |
| Akrosom groß/klein | 0 | 0 | 0 | * |
| Akrosom nicht vorhanden | 0 | 0 | 0 | * |
| Akrosom in Ablösung | 2,42 | 2,33 | 1,92 | 0,313 |
| Akrosom mit Vakuolen | 0 | 0 | 0,17 | 0 |
| Summe Kopf/Akrosom | 3,5 | 3,25 | 3,17 | 0,891 |
| Mittelstück asymmetrisch | 0 | 0 | 0 | * |
| Mittelstück gebrochen | 0,33 | 0,17 | 1 | 0,069 |
| Mittelstück verdickt/schmal | 0 | 0 | 0 | * |
| Summe Mittelstück | 0,33 | 0,17 | 1 | 0,069 |
| Hauptstück schleifenförmig | 8,42 | 7,33 | 6,92 | 0,605 |
| Hauptstück gerollt | 0,25 | 0,25 | 0,58 | 0,0246 |
| Hauptstück geknickt | 1,5 | 158 | 0,92 | 0,313 |
| Hauptstück gebrochen | 0,25 | 0,92 | 0,5 | 0,11 |
| Summe Hauptstück | 10,42 | 10,08 | 8,92 | 0,658 |
| Plasmotropfen Hals | 7,08 | 5,75 | 7,33 | 0,264 |
| Plasmotropfen Mittelstück | 4,25 | 3,5 | 2,67 | 0,0364 |
| Plasmotropfen Hauptstück | 0,17 | 0,08 | 0,17 | E |
| Summe Plasmotropfen | 11,5 | 9,33 | 10,17 | 0,256 |
| Einzelne Köpfe | 2,5 | 2,58 | 242 | 0,982 |

Ergebnisse

Tabelle 17: Mittelwerte der pathomorphologischen Merkmale (%) von mit Diff-Quick® gefärbten Präparaten bei unterschiedlichen Aufbewahrungstemperaturen und die statistische Relevanz der Abweichungen (p-Wert) zum Auswertungszeitpunkt 1 (sofort)

| Kriterium | Temperatur | | | |
|---|------------|-------|-------|-------------------|
| | 18°C | 38°C | 6°C | p-Wert |
| Spermien mit morphologischen Abweichungen | 22,17 | 21,33 | 22,5 | 0,884 |
| Kopf unregelmäßig | 0,42 | 0,17 | 0,83 | 0,024 |
| Kopf rund | 0,5 | 0,25 | 0,33 | 0,409 |
| Kopf lanzenförmig | 0 | 0 | 0 | * |
| Kopf birnenförmig | 0,08 | 0,08 | 0 | 0 |
| Doppelkopf | 0,17 | 0,08 | 0,17 | 0,851 |
| Akrosom groß/klein | 0 | 0 | 0 | * |
| Akrosom nicht vorhanden | 0 | 0 | 0 | * |
| Akrosom in Ablösung | 1,5 | 1,25 | 1 | 0,385 |
| Akrosom mit Vakuolen | 0 | 0 | 0 | * |
| Summe Kopf/Akrosom | 2,67 | 1,83 | 2,33 | 0,217 |
| Mittelstück asymmetrisch | 0 | 0 | 0 | * |
| Mittelstück gebrochen | 1,08 | 58 | 0,67 | 0,386 |
| Mittelstück verdickt/schmal | 0 | 0 | 0 | * |
| Summe Mittelstück | 1,08 | 0,58 | 0,67 | 0,386 |
| Hauptstück schleifenförmig | 8,67 | 9,25 | 10,33 | 0,463 |
| Hauptstück gerollt | 0,75 | 0,5 | 0,33 | 0,184 |
| Hauptstück geknickt | 3,83 | 2,75 | 2,58 | 0,161 |
| Hauptstück gebrochen | 0,33 | 0,67 | 0,17 | <0,0001 |
| Summe Hauptstück | 13,58 | 13,17 | 13,42 | 0,971 |
| Plasmatrophen Hals | 0,67 | 0,58 | 1,17 | 0,257 |
| Plasmatrophen Mittelstück | 1,67 | 192 | 1,31 | 0,499 |
| Plasmatrophen Hauptstück | 0 | 0 | 0 | * |
| Summe Plasmatrophen | 2,33 | 2,5 | 2,25 | 0,971 |
| Einzelne Köpfe | 2,5 | 3,25 | 3,83 | 0,439 |

Ergebnisse

Tabelle 18: Mittelwerte der pathomorphologischen Merkmale (%) von mit Hemacolor® gefärbten Präparaten bei unterschiedlichen Aufbewahrungstemperaturen und die statistische Relevanz der Abweichungen (p-Wert) zum Auswertungszeitpunkt 1 (sofort)

| Kriterium | Temperatur | | | |
|---|------------|-------|-------|---------------|
| | 18°C | 38°C | 6°C | p-Wert |
| Spermien mit morphologischen Abweichungen | 20,25 | 24,33 | 23,08 | 0,4 |
| Kopf unregelmäßig | 0,33 | 0,017 | 0,92 | 0,0032 |
| Kopf rund | 0,33 | 0,42 | 0,33 | 0,868 |
| Kopf lanzenförmig | 0 | 0,08 | 0 | 0 |
| Kopf birnenförmig | 0 | 0 | 0 | * |
| Doppelkopf | 0 | 0 | 0 | * |
| Akrosom groß/klein | 0 | 0 | 0 | * |
| Akrosom nicht vorhanden | 0 | 0 | 0 | * |
| Akrosom in Ablösung | 1,33 | 1,08 | 1,25 | 0,86 |
| Akrosom mit Vakuolen | 0 | 0,08 | 0 | 0 |
| Summe Kopf/Akrosom | 2 | 1,83 | 2,5 | 0,52 |
| Mittelstück asymmetrisch | 0 | 0 | 0 | * |
| Mittelstück gebrochen | 1,5 | 1 | 2,08 | 0,415 |
| Mittelstück verdickt/schmal | 0,08 | 0,08 | 0,25 | 0,115 |
| Summe Mittelstück | 1,58 | 1,08 | 2,33 | 0,275 |
| Hauptstück schleifenförmig | 7,08 | 6,67 | 7 | 0,95 |
| Hauptstück gerollt | 0,67 | 1,25 | 0,83 | 0,391 |
| Hauptstück geknickt | 3,42 | 3,75 | 4,67 | 0,508 |
| Hauptstück gebrochen | 0,25 | 0,42 | 0,17 | 0,0039 |
| Summe Hauptstück | 11,42 | 12,08 | 12,67 | 0,816 |
| Plasmatropfen Hals | 0,83 | 183 | 0,67 | 0,0195 |
| Plasmatropfen Mittelstück | 192 | 2,25 | 1,33 | 0,299 |
| Plasmatropfen Hauptstück | 0,08 | 0 | 0 | 0 |
| Summe Plasmatropfen | 2,83 | 4,08 | 2 | 0,0158 |
| Einzelne Köpfe | 2,42 | 5,25 | 3,58 | 0,0782 |

Ergebnisse

Bei mit Sangodiff-G® gefärbten Präparaten fallen zusätzlich zu den bereits beschriebenen statistisch signifikanten kleinen Werten mit verhältnismäßig großen Abweichungen („Kopf unregelmäßig“, „Doppelkopf“, Hauptstück gerollt/geknickt/gebrochen“, Plasmotropfen Hals und Hauptstück“) die Gesamtzahl der Spermien mit morphologischen Abweichungen, „Summe Hauptstück“ und „Summe Plasmotropfen“ auf. Die Gesamtzahl der Spermien mit morphologischen Abweichungen liegt mit 14 % bei 18°C deutlich niedriger als mit 19,25 % bei 38°C und 21,67 % bei 6°C Aufbewahrungstemperatur. Der Anstieg der morphologisch veränderten Samenzellen bei den Aufbewahrungstemperaturen 38°C und 6°C bestätigt sich in den Unterkategorien „Summe Hauptstück“ und „Summe Plasmotropfen“.

Tabelle 19: Mittelwerte der pathomorphologischen Merkmale (%) von mit Sangodiff-G® gefärbten Präparaten bei unterschiedlichen Aufbewahrungstemperaturen und die statistische Relevanz der Abweichungen (p-Wert) zum Auswertungszeitpunkt 1 (sofort)

| Kriterium | Temperatur | | | |
|---|------------|-------|-------|---------------|
| | 18°C | 38°C | 6°C | p-Wert |
| Spermien mit morphologischen Abweichungen | 14 | 19,25 | 21,67 | 0,0004 |
| Kopf unregelmäßig | 0,75 | 0,5 | 0,33 | 0,0235 |
| Kopf rund | 0,25 | 0,33 | 0,58 | 0,114 |
| Kopf lanzenförmig | 0 | 0 | 0 | * |
| Kopf birnenförmig | 0 | 0 | 0 | * |
| Doppelkopf | 0,08 | 0 | 0 | 0 |
| Akrosom groß/klein | 0 | 0 | 0 | * |
| Akrosom nicht vorhanden | 1 | 1,17 | 1,42 | 0,525 |
| Akrosom in Ablösung | 0,75 | 0,25 | 0,58 | 0,29 |
| Akrosom mit Vakuolen | 0 | 0 | 0 | * |
| Summe Kopf/Akrosom | 2,83 | 2,25 | 2,92 | 0,435 |
| Mittelstück asymmetrisch | 0 | 0 | 0 | * |
| Mittelstück gebrochen | 1 | 1,17 | 1 | 0,913 |
| Mittelstück verdickt/schmal | 0 | 0 | 0 | * |
| Summe Mittelstück | 1 | 1,17 | 1 | 0,913 |

Ergebnisse

| | | | | |
|----------------------------|------|-------|-------|---------------|
| Hauptstück schleifenförmig | 6,17 | 7,33 | 8,67 | 0,25 |
| Hauptstück gerollt | 0,33 | 1 | 1,42 | 0,0004 |
| Hauptstück geknickt | 1,42 | 2,75 | 2,17 | 0,0233 |
| Hauptstück gebrochen | 0,25 | 0,83 | 0,5 | 0,0004 |
| Summe Hauptstück | 8,17 | 11,92 | 12,75 | 0,0028 |
| Plasmatropfen Hals | 0,42 | 1 | 1 | 0,0388 |
| Plasmatropfen Mittelstück | 67 | 1,33 | 1,25 | 0,212 |
| Plasmatropfen Hauptstück | 0 | 0 | 0,08 | 0 |
| Summe Plasmatropfen | 1,08 | 2,33 | 2,83 | 0,0465 |
| Einzelne Köpfe | 0,92 | 158 | 217 | 0,0506 |

Ergebnisse

Mit Spermac® gefärbte Präparate zeigen ebenso eine statistisch signifikante Abweichung ($p = 0,0154$) bei der Gesamtzahl der morphologisch abweichenden Spermien. Bei 18°C gelagerten Samenzellen zeigen mit 27,75 % deutlich weniger morphologische Veränderungen als bei 38°C gelagerte Samenzellen mit 34,58 %. Dazwischen liegen bei 6°C gelagerte Samenzellen mit 29,17 % morphologisch veränderten Samenzellen.

Tabelle 20: Mittelwerte der pathomorphologischen Merkmale (%) von mit Spermac® gefärbten Präparaten bei unterschiedlichen Aufbewahrungstemperaturen und die statistische Relevanz der Abweichungen (p-Wert) zum Auswertungszeitpunkt 1 (sofort)

| Kriterium | Temperatur | | | |
|---|------------|-------|-------|-------------------|
| | 18°C | 38°C | 6°C | p-Wert |
| Spermien mit morphologischen Abweichungen | 27,75 | 34,58 | 29,17 | 0,0154 |
| Kopf unregelmäßig | 0,75 | 0,5 | 0,92 | 0,34 |
| Kopf rund | 0,25 | 0,58 | 0,67 | 0,267 |
| Kopf lanzenförmig | 0 | 0 | 0 | * |
| Kopf birnenförmig | 0 | 0 | 0 | * |
| Doppelkopf | 0,08 | 0 | 0 | 0 |
| Akrosom groß/klein | 0 | 0 | 0 | * |
| Akrosom nicht vorhanden | 1,83 | 0,75 | 0,83 | <0,0001 |
| Akrosom in Ablösung | 6,33 | 7,33 | 5,25 | 0,295 |
| Akrosom mit Vakuolen | 0 | 0,33 | 0,25 | 0,25 |
| Summe Kopf/Akrosom | 9,25 | 9,5 | 7,92 | 0,643 |
| Mittelstück asymmetrisch | 0 | 0 | 0 | * |
| Mittelstück gebrochen | 1,42 | 2 | 0,83 | 0,247 |
| Mittelstück verdickt/schmal | 0 | 0 | 0 | * |
| Summe Mittelstück | 1,42 | 2 | 0,83 | 0,247 |
| Hauptstück schleifenförmig | 7,17 | 9,17 | 9,5 | 0,252 |
| Hauptstück gerollt | 0,75 | 0,75 | 0,75 | 1 |
| Hauptstück geknickt | 1,42 | 1,08 | 1,25 | 0,807 |
| Hauptstück gebrochen | 1,67 | 1,17 | 0,83 | 0,268 |

Ergebnisse

| | | | | |
|---------------------------|------|-------|-------|---------------|
| Summe Hauptstück | 11 | 12,17 | 12,33 | 0,707 |
| Plasmatropfen Hals | 2,67 | 5 | 2 | 0,0193 |
| Plasmatropfen Mittelstück | 1,5 | 2,67 | 2 | 0,403 |
| Plasmatropfen Hauptstück | 0 | 0 | 0 | * |
| Summe Plasmatropfen | 4,17 | 7,67 | 4 | 0,0636 |
| Einzelne Köpfe | 1,92 | 3,25 | 4,08 | 0,149 |

Ergebnisse

Die Färbung mit Formolcitrat-Bengalrosa zeigt am wenigsten Kopf- und Akrosomveränderungen bei Samenzellen, die bei 38°C und 6°C gelagert wurden, und deutlich mehr morphologische Abweichungen bei einer Lagerung bei vorgeschriebenen 18°C. Die Summe der Hauptstückveränderungen zeigt eine gegenläufige Tendenz mit 8,25 % bei 18°C Lagerung und 12,42 % bzw. 12,33 % bei 38°C bzw. 6°C.

Tabelle 21: Mittelwerte der pathomorphologischen Merkmale (%) von mit Formolcitrat-Bengalrosa gefärbten Präparaten bei unterschiedlichen Aufbewahrungstemperaturen und die statistische Relevanz der Abweichungen (p-Wert) zum Auswertungszeitpunkt 1 (sofort)

| Kriterium | Temperatur | | | |
|---|------------|-------|-------|---------------|
| | 18°C | 38°C | 6°C | p-Wert |
| Spermien mit morphologischen Abweichungen | 29,17 | 24,75 | 25,83 | 0,438 |
| Kopf unregelmäßig | 0,17 | 0,67 | 0,58 | 0,237 |
| Kopf rund | 0,83 | 0,33 | 0,17 | 0,0513 |
| Kopf lanzenförmig | 14,76 | 3,38 | 5,42 | 0,0081 |
| Kopf birnenförmig | 0,08 | 0 | 0 | 0 |
| Doppelkopf | 0 | 0 | 0,08 | 0 |
| Akrosom groß/klein | 0 | 0 | 0 | * |
| Akrosom nicht vorhanden | 0 | 0 | 0 | * |
| Akrosom in Ablösung | 0,92 | 1,92 | 1,67 | 0,12 |
| Akrosom mit Vakuolen | 0 | 0,17 | 0,08 | 0,242 |
| Summe Kopf/Akrosom | 16,67 | 6,92 | 8 | 0,0027 |
| Mittelstück asymmetrisch | 0 | 0 | 0 | * |
| Mittelstück gebrochen | 0,17 | 0,25 | 0,42 | 0,578 |
| Mittelstück verdickt/schmal | 0,17 | 0 | 0,25 | 0,616 |
| Summe Mittelstück | 0,33 | 0,25 | 0,67 | 0,341 |
| Hauptstück schleifenförmig | 6,67 | 9,67 | 8,5 | 0,148 |
| Hauptstück gerollt | 0,67 | 1,58 | 1,5 | 0,0854 |
| Hauptstück geknickt | 0,75 | 0,83 | 1,5 | 0,835 |

Ergebnisse

| | | | | |
|---------------------------|------|-------|-------|---------------|
| Hauptstück gebrochen | 0,17 | 0,33 | 0,83 | 0,0002 |
| Summe Hauptstück | 8,25 | 12,42 | 12,33 | 0,0264 |
| Plasmatropfen Hals | 0,75 | 2,33 | 0,83 | 0,0255 |
| Plasmatropfen Mittelstück | 1,83 | 1,83 | 158 | 0,862 |
| Plasmatropfen Hauptstück | 0 | 0 | 0 | * |
| Summe Plasmatropfen | 2,58 | 4,17 | 2,42 | 0,097 |
| Einzelne Köpfe | 1,33 | 1 | 2,42 | 0,0084 |

Ergebnisse

Bei der Färbung mit Testsimplets® sind statistisch signifikante Abweichungen bei Werten > 5 % bei der Summe der Kopf- und Akrosomveränderungen zu finden, wo die Lagerung bei 6°C die wenigsten morphologischen Veränderungen des Kopfes und des Akrosomes aufweist.

Tabelle 22: Mittelwerte der pathomorphologischen Merkmale (%) von mit Testsimplets® gefärbten Präparaten bei unterschiedlichen Aufbewahrungstemperaturen und die statistische Relevanz der Abweichungen (p-Wert) zum Auswertungszeitpunkt 1 (sofort)

| Kriterium | Temperatur | | | |
|---|------------|-------|-------|-------------------|
| | 18°C | 38°C | 6°C | p-Wert |
| Spermien mit morphologischen Abweichungen | 32,67 | 30,67 | 32,08 | 0,782 |
| Kopf unregelmäßig | 0,92 | 0,17 | 0,5 | <0,0001 |
| Kopf rund | 0,42 | 0,75 | 0 | 0,0325 |
| Kopf lanzenförmig | 3,75 | 5,67 | 2,17 | 0,00429 |
| Kopf birnenförmig | 0 | 0 | 0,67 | 0 |
| Doppelkopf | 0 | 0 | 0 | * |
| Akrosom groß/klein | 0 | 0 | 0,08 | 0 |
| Akrosom nicht vorhanden | 0,25 | 0 | 0,25 | 1 |
| Akrosom in Ablösung | 0,33 | 0,42 | 0,58 | 0,59 |
| Akrosom mit Vakuolen | 0 | 0 | 0 | * |
| Summe Kopf/Akrosom | 5,67 | 7 | 4,25 | 0,0455 |
| Mittelstück asymmetrisch | 0 | 0 | 0 | * |
| Mittelstück gebrochen | 0,33 | 0,42 | 0,17 | 0,157 |
| Mittelstück verdickt/schmal | 0,08 | 0 | 0 | 0 |
| Summe Mittelstück | 0,42 | 0,42 | 0,17 | 0,125 |
| Hauptstück schleifenförmig | 9 | 9 | 12,67 | 0,0006 |
| Hauptstück gerollt | 0,75 | 1,25 | 0,58 | 0,0439 |
| Hauptstück geknickt | 1,33 | 1,08 | 0,58 | 0,0101 |
| Hauptstück gebrochen | 0,33 | 0,17 | 0,8 | 0,0002 |
| Summe Hauptstück | 11,42 | 11,5 | 13,9 | 0,0975 |
| Plasmotropfen Hals | 9,17 | 6,17 | 7,17 | 0,0546 |

Ergebnisse

| | | | | |
|---------------------------|-------|-------|-------|--------|
| Plasmotropfen Mittelstück | 5,17 | 4,08 | 5,67 | 0,32 |
| Plasmotropfen Hauptstück | 0 | 0 | 0 | * |
| Summe Plasmotropfen | 14,33 | 10,25 | 12,83 | 0,0813 |
| Einzelne Köpfe | 0,83 | 1,5 | 0,92 | 0,416 |

Ergebnisse

Tabelle 23: Mittelwerte der pathomorphologischen Merkmale (%) von mit Methyl-Violett gefärbter Präparate bei unterschiedlichen Aufbewahrungstemperaturen und die statistische Relevanz der Abweichungen (p-Wert) zum Auswertungszeitpunkt 1 (sofort)

| Kriterium | Temperatur | | | |
|---|------------|-------|-------|------------------|
| | 18°C | 38°C | 6°C | p-Wert |
| Spermien mit morphologischen Abweichungen | 73,67 | 73,25 | 77,67 | 0,374 |
| Kopf unregelmäßig | 0 | 0 | 0 | * |
| Kopf rund | 0 | 0 | 0,08 | 0 |
| Kopf lanzenförmig | 70,67 | 70,33 | 73 | 0,947 |
| Kopf birnenförmig | 0 | 0 | 0 | * |
| Doppelkopf | 0 | 0 | 0 | * |
| Akrosom groß/klein | 0 | 0 | 0 | * |
| Akrosom nicht vorhanden | 0 | 0 | 0 | * |
| Akrosom in Ablösung | 0 | 0 | 0 | * |
| Akrosom mit Vakuolen | 0 | 0 | 0 | * |
| Summe Kopf/Akrosom | 70,67 | 70,33 | 73,08 | 0,943 |
| Mittelstück asymmetrisch | 0 | 0 | 0 | * |
| Mittelstück gebrochen | 0,5 | 0 | 1,42 | E |
| Mittelstück verdickt/schmal | 0 | 0 | 0 | * |
| Summe Mittelstück | 0,5 | 0 | 1,42 | E |
| Hauptstück schleifenförmig | 1,42 | 2 | 192 | <,0001 |
| Hauptstück gerollt | 0 | 0 | 0 | * |
| Hauptstück geknickt | 0,5 | 0,75 | 1 | 0,26 |
| Hauptstück gebrochen | 0 | 0 | 0 | * |
| Summe Hauptstück | 1,92 | 2,75 | 2,92 | 0,00753 |
| Plasmotropfen Hals | 0 | 0 | 0 | * |
| Plasmotropfen Mittelstück | 0,17 | 0 | 0 | 0 |
| Plasmotropfen Hauptstück | 0 | 0 | 0 | * |
| Summe Plasmotropfen | 0,17 | 0 | 0 | 0 |
| Einzelne Köpfe | 0,42 | 0,17 | 0,25 | 0,0303 |

4.6 Lagerfähigkeit der gefärbten Objektträger

Um die Lagerfähigkeit der gefärbten Ausstriche beurteilen zu können, erfolgte in Kapitel 4.3 bereits die Beurteilung der Farbintensität, Detailerkennbarkeit und des Kontrastes zu den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten (ZP 1 = sofort, ZP 2 = nach einem Tag, ZP 3 = nach einer Woche, ZP 4 = nach 3 Monaten). Darüber hinaus wurden die Besonderheiten jeder Färbung bezüglich ihrer Veränderung während der Lagerung erfasst. Um zu beurteilen, ob es zusätzlich qualitative Unterschiede zwischen den verschiedenen Färbungen hinsichtlich ihrer Archivierbarkeit gibt, wurden die prozentualen Anteile der einzelnen pathomorphologischen Merkmale der Samenanalyse zu den unterschiedlichen Zeitpunkten verglichen. Das Ergebnis der statistischen Auswertung zu den verschiedenen Zeitpunkten ist in Tabellen 25 - 33 zusammengefasst. Grundsätzlich waren die beschriebenen Unterschiede nur dann statistisch relevant ($p\text{-Wert} < 0,05$), wenn die durchschnittlichen Werte sehr niedrig sind ($< 5\%$) und im Verhältnis zu diese niedrigen Werten große Abweichungen bestehen.

Die Beurteilung der Vitalität mit den Färbemethoden Eosin und Eosin-Nigrosin über alle Aufbewahrungstemperaturen (18°C , 38°C , 6°C) hinweg ergab zu den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten die in Tabelle 24 aufgeführten Ergebnisse.

Tabelle 24: Mittelwerte der Vitalität (vital/nicht vital in %) von mit Eosin- und Eosin-Nigrosin-gefärbten Präparaten zu den unterschiedlichen Auswertungszeitpunkten

| Untersuchungszeitpunkt | Eosin | Eosin-Nigrosin |
|------------------------|---------------|----------------|
| 1 | 79,72 / 20,28 | 85,29 / 14,61 |
| 2 | 80,85 / 19,15 | 83,50 / 16,50 |
| 3 | 77,69 / 22,31 | 85,11 / 14,89 |
| 4 | 76,00 / 24,00 | 80,54 / 19,46 |

Ergebnisse

Tabelle 25: Mittelwerte der pathomorphologischen Merkmale (%) von mit Eosin gefärbten Präparaten zu den unterschiedlichen Auswertungszeitpunkten und die statistische Relevanz der Abweichungen (p-Wert)

| Kriterium | Auswertungszeitpunkt | | | | |
|----------------------------------|----------------------|-------|-------|------|----------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | p-Wert |
| Spermien mit morph. Abweichungen | 26,53 | 26,61 | 26,08 | 24,8 | 0,894 |
| Kopf unregelmäßig | 0,36 | 0,08 | 0,17 | 0,8 | 0,0135 |
| Kopf rund | 0,53 | 0,64 | 0,89 | 0,66 | 1 |
| Kopf lanzenförmig | 0,06 | 0,06 | 0,03 | 0,03 | 1 |
| Kopf birnenförmig | 0 | 0 | 0,11 | 0,03 | 1 |
| Doppelkopf | 0 | 0,03 | 0,03 | 0 | 1 |
| Akrosom groß/klein | 0 | 0 | 0 | 0 | * |
| Akrosom nicht vorhanden | 0,11 | 0,14 | 0,08 | 0,34 | 0,00549 |
| Akrosom in Ablösung | 4,53 | 3,86 | 4,31 | 3,89 | 0,955 |
| Akrosom mit Vakuolen | 0 | 0 | 0,03 | 0 | 1 |
| Summe Kopf/Akrosom | 5,58 | 4,81 | 5,64 | 5,74 | 0,773 |
| Mittelstück asymmetrisch | 0 | 0 | 0 | 0 | * |
| Mittelstück gebrochen | 1,69 | 1,17 | 1,56 | 0,86 | 0,00443 |
| Mittelstück verdickt/schmal | 0,08 | 0 | 0 | 0,03 | 1 |
| Summe Mittelstück | 1,78 | 1,17 | 1,56 | 0,89 | 0,00213 |
| Hauptstück schleifenförmig | 7,17 | 7,42 | 6,17 | 6,26 | 0,509 |
| Hauptstück gerollt | 0,86 | 0,72 | 0,72 | 0,83 | 0,534 |
| Hauptstück geknickt | 1,92 | 2,39 | 2,47 | 2,49 | 0,702 |
| Hauptstück gebrochen | 0,78 | 0,81 | 0,33 | 0,14 | 0,241 |
| Summe Hauptstück | 10,72 | 11,33 | 9,69 | 9,71 | 0,905 |
| Plasmotropfen Hals | 1,47 | 3 | 2,56 | 2,17 | 0,0823 |
| Plasmotropfen Mittelstück | 3,08 | 3,28 | 3,53 | 2,74 | 0,943 |
| Plasmotropfen Hauptstück | 0,06 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Summe Plasmotropfen | 4,61 | 6,28 | 6,08 | 4,91 | 0,841 |
| Einzelne Köpfe | 3,83 | 3,03 | 3,11 | 3,54 | 0,886 |

Ergebnisse

Tabelle 26: Mittelwerte der pathomorphologischen Merkmale (%) von mit Eosin-Nigrosin gefärbten Präparaten zu den unterschiedlichen Auswertungszeitpunkten und die statistische Relevanz der Abweichungen (p-Wert)

| Kriterium | Auswertungszeitpunkt | | | | |
|----------------------------------|----------------------|-------|-------|-------|----------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | p-Wert |
| Spermien mit morph. Abweichungen | 26,44 | 26,22 | 25,75 | 24,44 | 0,68 |
| Kopf unregelmäßig | 0,58 | 0,14 | 0,14 | 0,61 | 0,0163 |
| Kopf rund | 0,33 | 0,42 | 0,69 | 0,53 | 0,192 |
| Kopf lanzenförmig | 0,03 | 0,17 | 0 | 0,03 | 1 |
| Kopf birnenförmig | 0,06 | 0,03 | 0 | 0 | E |
| Doppelkopf | 0,03 | 0 | 0 | 0,03 | 1 |
| Akrosom groß/klein | 0 | 0 | 0 | 0 | * |
| Akrosom nicht vorhanden | 0 | 0 | 0,06 | 0,22 | 0,00645 |
| Akrosom in Ablösung | 2,22 | 2,36 | 2,72 | 2,19 | 0,98 |
| Akrosom mit Vakuolen | 0,06 | 0 | 0,03 | 0 | 1 |
| Summe Kopf/Akrosom | 3,31 | 311 | 3,64 | 3,61 | 0,831 |
| Mittelstück asymmetrisch | 0 | 0 | 0 | 0 | * |
| Mittelstück gebrochen | 0,5 | 0,81 | 0,47 | 0,67 | 0,871 |
| Mittelstück verdickt/schmal | 0 | 0 | 0,06 | 0 | 0 |
| Summe Mittelstück | 0,5 | 0,81 | 0,53 | 0,67 | 0,757 |
| Hauptstück schleifenförmig | 7,56 | 8,33 | 7,75 | 7,31 | 0,935 |
| Hauptstück gerollt | 0,36 | 0,72 | 0,75 | 0,44 | 0,0085 |
| Hauptstück geknickt | 1,33 | 183 | 1,44 | 0,94 | 0,286 |
| Hauptstück gebrochen | 56 | 0,47 | 0,44 | 0,11 | 0,899 |
| Summe Hauptstück | 9,81 | 11,36 | 10,39 | 8,81 | 0,377 |
| Plasmotropfen Hals | 6,72 | 5,67 | 5,53 | 5,42 | 0,96 |
| Plasmotropfen Mittelstück | 3,47 | 3,25 | 3,36 | 3,39 | 0,914 |
| Plasmotropfen Hauptstück | 0,14 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Summe Plasmotropfen | 10,33 | 8,92 | 889 | 8,81 | 0,917 |
| Einzelne Köpfe | 2,5 | 2,03 | 2,31 | 2,56 | 0,948 |

Ergebnisse

Tabelle 27: Mittelwerte der pathomorphologischen Merkmale (%) von mit Diff-Quick® gefärbten Präparaten zu den unterschiedlichen Auswertungszeitpunkten und die statistische Relevanz der Abweichungen (p-Wert)

| Kriterium | Auswertungszeitpunkt | | | | |
|----------------------------------|----------------------|-------|-------|-------|----------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | p-Wert |
| Spermien mit morph. Abweichungen | 22 | 22,25 | 21,39 | 18,89 | 0,84 |
| Kopf unregelmäßig | 0,47 | 0,19 | 0,14 | 0,39 | 0,847 |
| Kopf rund | 0,36 | 0,36 | 0,39 | 0,56 | 0,571 |
| Kopf lanzenförmig | 0 | 0,03 | 0 | 0 | 1 |
| Kopf birnenförmig | 0,06 | 0,03 | 0,03 | 0,08 | 1 |
| Doppelkopf | 0,14 | 0 | 0,06 | 0 | 1 |
| Akrosom groß/klein | 0 | 0 | 0 | 0 | * |
| Akrosom nicht vorhanden | 0 | 0 | 0 | 0 | * |
| Akrosom in Ablösung | 1,25 | 1,69 | 1,44 | 1,28 | 0,954 |
| Akrosom mit Vakuolen | 0 | 0 | 0,03 | 0 | 1 |
| Summe Kopf/Akrosom | 2,28 | 2,31 | 2,08 | 2,31 | 0,527 |
| Mittelstück asymmetrisch | 0 | 0 | 0,06 | 0 | 1 |
| Mittelstück gebrochen | 0,78 | 0,5 | 0,83 | 0,69 | 0,243 |
| Mittelstück verdickt/schmal | 0 | 0,03 | 0,03 | 0 | 1 |
| Summe Mittelstück | 0,78 | 53 | 0,92 | 0,69 | 0,283 |
| Hauptstück schleifenförmig | 9,42 | 8,94 | 7,81 | 6,94 | 0,372 |
| Hauptstück gerollt | 0,53 | 0,64 | 0,67 | 0,58 | 0,88 |
| Hauptstück geknickt | 3,06 | 1,72 | 2,44 | 2,06 | 0,0173 |
| Hauptstück gebrochen | 0,39 | 1,78 | 1 | 0,36 | 0,00961 |
| Summe Hauptstück | 13,39 | 13,08 | 11,92 | 9,94 | 0,0914 |
| Plasmotropfen Hals | 0,81 | 15 | 1,17 | 1,11 | 0,0374 |
| Plasmotropfen Mittelstück | 1,56 | 2,28 | 1,89 | 1,39 | 0,517 |
| Plasmotropfen Hauptstück | 0 | 0 | 0 | 0 | * |
| Summe Plasmotropfen | 2,36 | 3,78 | 3,06 | 2,5 | 0,127 |
| Einzelne Köpfe | 3,19 | 2,56 | 3,42 | 3,44 | 0,32 |

Ergebnisse

Bei mit Hemacolor® gefärbten Präparaten wurden bei sofortiger Auswertung durchschnittlich 22,56 %, nach einem Tag 23,56 %, nach einer Woche 20,56 % und nach drei Monaten nur noch 18,47 % morphologisch veränderte Samenzellen erkannt ($p = 0,0273$). Eine weitere dazu passende signifikante Abweichung findet sich bei der Wahrnehmung von Plasmotropfen zu den verschiedenen Zeitpunkten. Zum Zeitpunkt 1 werden durchschnittlich 2,97 % Plasmotropfen erkannt, zum Zeitpunkt 2 3,56 %, zum Zeitpunkt 3 und 4 nur noch 2,11 % (Tabelle 28).

Tabelle 28: Mittelwerte der pathomorphologischen Merkmale (%) von mit Hemacolor®-gefärbten Präparaten zu den unterschiedlichen Auswertungszeitpunkten und die statistische Relevanz der Abweichungen (p-Wert)

| Kriterium | Auswertungszeitpunkt | | | | |
|----------------------------------|----------------------|-------|-------|-------|---------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | p-Wert |
| Spermien mit morph. Abweichungen | 22,56 | 23,56 | 20,56 | 18,47 | 0,0273 |
| Kopf unregelmäßig | 0,47 | 0,14 | 0,28 | 0,31 | 0,442 |
| Kopf rund | 0,36 | 0,33 | 0,19 | 0,56 | 0,941 |
| Kopf lanzenförmig | 0,03 | 0,03 | 0 | 0,08 | 1 |
| Kopf birnenförmig | 0 | 0,03 | 0,03 | 0 | 1 |
| Doppelkopf | 0 | 0 | 0,03 | 0 | 1 |
| Akrosom groß/klein | 0 | 0 | 0 | 0 | * |
| Akrosom nicht vorhanden | 0 | 0 | 0 | 0 | * |
| Akrosom in Ablösung | 1,22 | 1,44 | 1,89 | 1,67 | 0,436 |
| Akrosom mit Vakuolen | 0,03 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Summe Kopf/Akrosom | 2,11 | 1,97 | 2,42 | 2,61 | 0,398 |
| Mittelstück asymmetrisch | 0 | 0 | 0 | 0 | * |
| Mittelstück gebrochen | 1,53 | 1,53 | 0,78 | 0,75 | 0,535 |
| Mittelstück verdickt/schmal | 0,14 | 0,03 | 0,03 | 0 | 1 |
| Summe Mittelstück | 2,15 | 2,44 | 1,04 | 0,97 | 0,406 |
| Hauptstück schleifenförmig | 6,92 | 7,22 | 7,42 | 7,06 | 0,999 |

Ergebnisse

| | | | | | |
|---------------------------|-------|-------|-------|-------|-------------------|
| Hauptstück gerollt | 0,92 | 1 | 0,31 | 0,69 | 0,146 |
| Hauptstück geknickt | 3,94 | 3,67 | 4,19 | 2,42 | 0,173 |
| Hauptstück gebrochen | 0,28 | 1,06 | 0,36 | 0,06 | <0,0001 |
| Summe Hauptstück | 12,06 | 12,94 | 12,28 | 10,22 | 0,408 |
| Plasmatropfen Hals | 1,11 | 1,56 | 0,83 | 1,08 | 0,0135 |
| Plasmatropfen Mittelstück | 1,83 | 2 | 1,28 | 1,08 | 0,0135 |
| Plasmatropfen Hauptstück | 0,03 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Summe Plasmatropfen | 2,97 | 3,56 | 2,11 | 2,11 | 0,0000247 |
| Einzelne Köpfe | 3,75 | 3,53 | 2,94 | 2,78 | 0,893 |

Ergebnisse

Wie in Tabelle 29 dargestellt weisen mit Sangodiff-G® gefärbte Präparate ebenfalls eine statistisch signifikante Abweichung bei der Gesamtzahl der Spermien mit morphologischen Abweichungen auf. Hier fällt der prozentuale Anteil von 18,31 bei sofortiger Auswertung mit einem zwischenzeitlichen Anstieg auf 20,5 nach einer Woche, nach 3 Monaten auf 17,63 % nicht Normale Samenzellen ab ($p = 0,00229$). Des Weiteren fällt der sinkende Anteil Hautstückveränderungen von 10,94 % bei der Erstuntersuchung auf 9,16% nach drei Monaten auf.

Tabelle 29: Mittelwerte der pathomorphologischen Merkmale (%) von mit Sangodiff-G® gefärbten Präparaten zu den unterschiedlichen Auswertungszeitpunkten und die statistische Relevanz der Abweichungen (p-Wert)

| Kriterium | Auswertungszeitpunkt | | | | |
|----------------------------------|----------------------|-------|------|-------|----------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | p-Wert |
| Spermien mit morph. Abweichungen | 18,31 | 18,67 | 20,5 | 17,63 | 0,00229 |
| Kopf unregelmäßig | 0,53 | 0,36 | 0,3 | 0,58 | 0,525 |
| Kopf rund | 0,39 | 0,42 | 0,58 | 0,42 | 0,639 |
| Kopf lanzenförmig | 0 | 0 | 0,03 | 0 | 0 |
| Kopf birnenförmig | 0 | 0,03 | 0 | 0 | 0 |
| Doppelkopf | 0,03 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Akrosom groß/klein | 0 | 0 | 0 | 0 | * |
| Akrosom nicht vorhanden | 1,19 | 1,39 | 1,09 | 1,32 | 0,276 |
| Akrosom in Ablösung | 0,53 | 0,5 | 0,61 | 1,63 | 0,978 |
| Akrosom mit Vakuolen | 0 | 0 | 0,03 | 0 | 0 |
| Summe Kopf/Akrosom | 2,67 | 2,69 | 2,64 | 3,89 | 0,602 |
| Mittelstück asymmetrisch | 0 | 0 | 0 | 0,05 | 0 |
| Mittelstück gebrochen | 1,06 | 1,19 | 1,61 | 0,95 | 0,954 |
| Mittelstück verdickt/schmal | 0 | 0 | 0 | 0 | * |
| Summe Mittelstück | 1,06 | 1,19 | 1,61 | 0,95 | 0,954 |
| Hauptstück schleifenförmig | 7,39 | 7,19 | 7,39 | 6,68 | 0,261 |

Ergebnisse

| | | | | | |
|---------------------------|-------|------|-------|------|-------------------|
| Hauptstück gerollt | 0,92 | 0,64 | 0,76 | 0,84 | 0,00441 |
| Hauptstück geknickt | 2,11 | 1,81 | 2,36 | 1,26 | 0,607 |
| Hauptstück gebrochen | 0,53 | 0,19 | 0,73 | 0,37 | 0,0106 |
| Summe Hauptstück | 10,94 | 9,83 | 11,24 | 9,16 | 0,00912 |
| Plasmotropfen Hals | 0,97 | 1,06 | 0,94 | 1,05 | 0,151 |
| Plasmotropfen Mittelstück | 1,08 | 1,31 | 1,36 | 1,16 | 0,273 |
| Plasmotropfen Hauptstück | 0,03 | 0 | 0 | 0 | <0,0001 |
| Summe Plasmotropfen | 2,09 | 2,39 | 2,3 | 2,21 | 0,167 |
| Einzelne Köpfe | 1,56 | 2,56 | 2,73 | 1,37 | 0,143 |

Ergebnisse

Tabelle 30: Mittelwerte der pathomorphologischen Merkmale (%) von mit Spermac® gefärbten Präparaten zu den unterschiedlichen Auswertungszeitpunkten und die statistische Relevanz der Abweichungen (p-Wert)

| Kriterium | Auswertungszeitpunkt | | | | |
|----------------------------------|----------------------|-------|-------|-------|---------------|
| | | | | | |
| Spermien mit morph. Abweichungen | 30,5 | 30,33 | 27,89 | 25,22 | 0,238 |
| Kopf unregelmäßig | 0,72 | 0,33 | 0,61 | 0,36 | 0,477 |
| Kopf rund | 0,5 | 0,62 | 0,44 | 0,44 | 0,292 |
| Kopf lanzenförmig | 0 | 0,08 | 0 | 0 | E |
| Kopf birnenförmig | 0 | 0 | 0 | 0 | * |
| Doppelkopf | 0,03 | 0,03 | 0 | 0 | 0 |
| Akrosom groß/klein | 0 | 0 | 0 | 0 | * |
| Akrosom nicht vorhanden | 1,14 | 0,72 | 1 | 1,53 | 0,056 |
| Akrosom in Ablösung | 6,31 | 6,39 | 7,19 | 6,39 | 0,891 |
| Akrosom mit Vakuolen | 0,19 | 0,06 | 0,06 | 0 | 1 |
| Summe Kopf/Akrosom | 8,89 | 8,22 | 9,31 | 8,72 | 0,907 |
| Mittelstück asymmetrisch | 0 | 0 | 0 | 0 | * |
| Mittelstück gebrochen | 1,42 | 1,31 | 1,33 | 0,69 | 0,151 |
| Mittelstück verdickt/schmal | 0 | 0,03 | 0 | 0 | 1 |
| Summe Mittelstück | 1,42 | 1,33 | 1,33 | 0,69 | 0,155 |
| Hauptstück schleifenförmig | 8,61 | 8,69 | 7,92 | 7,11 | 0,119 |
| Hauptstück gerollt | 0,75 | 0,61 | 0,78 | 0,31 | 0,0393 |
| Hauptstück geknickt | 1,25 | 1,17 | 1,61 | 1,08 | 0,866 |
| Hauptstück gebrochen | 1,22 | 0,92 | 1,11 | 0,61 | 0,515 |
| Summe Hauptstück | 11,83 | 11,39 | 11,42 | 9,11 | 0,106 |
| Plasmotropfen Hals | 3,22 | 3,33 | 1,97 | 2,08 | 0,261 |
| Plasmotropfen Mittelstück | 2,06 | 2,39 | 1,81 | 1,97 | 0,993 |
| Plasmotropfen Hauptstück | 0 | 0 | 0 | 0 | * |
| Summe Plasmotropfen | 5,28 | 5,72 | 3,78 | 4,06 | 0,706 |
| Einzelne Köpfe | 3,08 | 3,67 | 2,06 | 2,64 | 0,87 |

Ergebnisse

Die Färbung mit Formolcitrat-Bengalrosa zeichnete sich bei sofortiger Auswertung durch deutlich mehr Kopf- und Kopfkappenveränderungen (10,53 %) als nach einem Tag (4,69 %), einer Woche (4,83 %) oder nach drei Monaten (4,32 %). Passend dazu fällt weiterhin die Abnahme der lanzenförmigen Kopfveränderungen im Laufe der drei Monate auf (Tabelle 31).

Tabelle 31: Mittelwerte der pathomorphologischen Merkmale (%) von mit Formolcitrat-Bengalrosa gefärbten Präparaten zu den unterschiedlichen Auswertungszeitpunkten und die statistische Relevanz der Abweichungen (p-Wert)

| Kriterium | Auswertungszeitpunkt | | | | |
|----------------------------------|----------------------|-------|-------|-------|-------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | p-Wert |
| Spermien mit morph. Abweichungen | 26,58 | 23,56 | 23,69 | 22,32 | 0,158 |
| Kopf unregelmäßig | 0,47 | 0,36 | 0,31 | 0,24 | 0,535 |
| Kopf rund | 0,44 | 0,33 | 0,47 | 0,74 | 0,126 |
| Kopf lanzenförmig | 7,97 | 0,39 | 0,11 | 0,09 | <0,0001 |
| Kopf birnenförmig | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,09 | 1 |
| Doppelkopf | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 1 |
| Akrosom groß/klein | 0 | 0 | 0 | 0 | * |
| Akrosom nicht vorhanden | 0 | 0,17 | 0,11 | 0,32 | 0,339 |
| Akrosom in Ablösung | 1,5 | 3,39 | 3,78 | 2,82 | 0,00288 |
| Akrosom mit Vakuolen | 0,08 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Summe Kopf/Akrosom | 10,53 | 4,69 | 4,83 | 4,32 | <0,0001 |
| Mittelstück asymmetrisch | 0 | 0 | 0 | 0 | * |
| Mittelstück gebrochen | 0,28 | 0,25 | 0,61 | 0,32 | 0,016 |
| Mittelstück verdickt/schmal | 0,14 | 0 | 0,08 | 0 | 0,51 |
| Summe Mittelstück | 0,42 | 0,25 | 0,69 | 0,32 | 0,0181 |
| Hauptstück schleifenförmig | 8,28 | 9,64 | 9,53 | 8,68 | 0,00846 |
| Hauptstück gerollt | 1,25 | 1,14 | 1,03 | 0,97 | 0,263 |
| Hauptstück geknickt | 1,03 | 1,14 | 1,06 | 0,62 | 0,151 |
| Hauptstück gebrochen | 0,44 | 0,92 | 0,53 | 0,5 | 0,911 |

Ergebnisse

| | | | | | |
|---------------------------|------|-------|-------|-------|----------------|
| Summe Hauptstück | 11 | 12,83 | 12,14 | 10,76 | 0,00263 |
| Plasmatrophen Hals | 1,31 | 1,67 | 1,64 | 2,15 | 0,088 |
| Plasmatrophen Mittelstück | 1,75 | 1,69 | 2,36 | 2,09 | 0,312 |
| Plasmatrophen Hauptstück | 0 | 0 | 0 | 0 | * |
| Summe Plasmatrophen | 3,06 | 3,36 | 4 | 4,24 | 0,155 |
| Einzelne Köpfe | 1,58 | 2,42 | 2,03 | 2,68 | 0,01 |

Ergebnisse

Bei der statistischen Auswertung der Archivierbarkeit der mit Testsimplets® gefärbten Präparate konnte auf Grund der abnehmenden Auswertbarkeit zu den späteren Untersuchungszeitpunkten (siehe Ergebnisse Kapitel 1.3, Tabelle 10) keine zuverlässige Bestimmung der Signifikanz erfolgen (E). Aus diesem Grund wurde die Untersuchung ein zweites Mal ohne Bezug auf den Zeitpunkt 4 durchgeführt. Es fällt ein deutlich reduzierter Anteil Spermien mit morphologischen Abweichungen von 31,81 % bei sofortiger Auswertung auf 14 % nach drei Monaten auf. Zusätzlich zeigt sich ein deutlicher Abfall der lanzenförmigen Veränderungen ab Zeitpunkt 2 (Tabelle 32).

Tabelle 32: Mittelwerte der pathomorphologischen Merkmale (%) von mit Testsimplets® gefärbten Präparaten zu den unterschiedlichen Auswertungszeitpunkten und die statistische Relevanz der Abweichungen

| Kriterium | Auswertungszeitpunkt | | | | | |
|-----------------------------|----------------------|-------|-------|-----|--------|-----------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | p-Wert | p-Wert (ohne ZP 4) |
| Spermien mit morph. Abw. | 31,81 | 37,46 | 24,76 | 14 | E | 0,345 |
| Kopf unregelmäßig | 0,53 | 0,4 | 0,32 | 1 | E | 0,504 |
| Kopf rund | 0,39 | 0,46 | 0,56 | 0,5 | E | 0,342 |
| Kopf lanzenförmig | 3,86 | 0,4 | 0,32 | 0 | E | <0,000 |
| Kopf birnenförmig | 0,22 | 0,06 | 0 | 0 | E | 1 |
| Doppelkopf | 0 | 0 | 0 | 0 | * | * |
| Akrosom groß/klein | 0,03 | 0,03 | 0 | 0 | E | <0,000 |
| Akrosom nicht vorhanden | 0,17 | 0,2 | 0,28 | 0 | E | 0,656 |
| Akrosom in Ablösung | 0,44 | 1,2 | 1,2 | 0 | E | 0,793 |
| Akrosom mit Vakuolen | 0 | 0,03 | 0,04 | 0 | E | 1 |
| Summe Kopf/Akrosom | 5,64 | 2,86 | 2,72 | 1,5 | E | 0,0008 |
| Mittelstück asymmetrisch | 0 | 0 | 0 | 0 | * | * |
| Mittelstück gebrochen | 0,31 | 0,91 | 1,28 | 0 | E | 0,442 |
| Mittelstück verdickt/schmal | 0,03 | 0 | 0 | 0 | E | 0 |
| Summe Mittelstück | 0,33 | 0,91 | 1,28 | 0 | E | 0,613 |

Ergebnisse

| | | | | | | |
|----------------------------|-------|-------|------|-----|---|---------------|
| Hauptstück schleifenförmig | 10,22 | 10,51 | 7,8 | 6,5 | E | 0,838 |
| Hauptstück gerollt | 0,86 | 1,31 | 0,32 | 0 | E | 0,273 |
| Hauptstück geknickt | 1 | 1,23 | 1,32 | 1,5 | E | 0,828 |
| Hauptstück gebrochen | 0,19 | 0,29 | 0,28 | 0 | E | 0,127 |
| Summe Hauptstück | 12,28 | 13,34 | 9,72 | 8 | E | 0,688 |
| Plasmatropfen Hals | 7,5 | 10,6 | 5,08 | 1,5 | E | 0,0704 |
| Plasmatropfen Mittelstück | 4,97 | 6,71 | 4,44 | 1 | E | 0,0005 |
| Plasmatropfen Hauptstück | 0 | 0,03 | 0 | 0 | E | 0 |
| Summe Plasmatropfen | 12,47 | 17,34 | 9,52 | 2,5 | E | 0,0828 |
| Einzelne Köpfe | 1,08 | 3 | 1,52 | 2 | E | 0,118 |

Ergebnisse

Bei mit Methyl-Violett gefärbten Präparaten konnte nach einer Woche keine Auswertung mehr erfolgen, so dass nur die beiden ersten Zeitpunkte miteinander verglichen wurden. Bei sofortiger Auswertung traten durchschnittlich 71,33 % lanzenförmige Kopfveränderungen auf, die nach einem Tag auf 0,75 % reduziert waren. Ebenso auffällig steigerte sich die Zahl der schleifenförmigen und geknickten Hauptstücke vom Zeitpunkt 1 (1,78 % bzw. 0,75 %) zum Zeitpunkt 2 auf 19,86 % bzw. 10,61 % (p-Wert < 0,0001 bzw. 0,00167) (Tabelle 33).

Tabelle 33: Mittelwerte der pathomorphologischen Merkmale (%) von mit Methyl-Violett gefärbten Präparaten zu den unterschiedlichen Auswertungszeitpunkten und die statistische Relevanz der Abweichungen (p-Wert); N = keine Auswertung erfolgt

| Kriterium | Auswertungszeitpunkt | | | | |
|----------------------------------|----------------------|-------|---|---|-------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | p-Wert |
| Spermien mit morph. Abweichungen | 74,86 | 35,44 | N | N | <0,0001 |
| Kopf unregelmäßig | 0 | 0 | N | N | * |
| Kopf rund | 0,03 | 0,09 | N | N | 1 |
| Kopf lanzenförmig | 71,33 | 0,75 | N | N | <0,0001 |
| Kopf birnenförmig | 0 | 0 | N | N | * |
| Doppelkopf | 0 | 0 | N | N | * |
| Akrosom groß/klein | 0 | 0 | N | N | * |
| Akrosom nicht vorhanden | 0 | 0 | N | N | * |
| Akrosom in Ablösung | 0 | 0,14 | N | N | 1 |
| Akrosom mit Vakuolen | 0 | 0 | N | N | * |
| Summe Kopf/Akrosom | 71,36 | 0,97 | N | N | <0,0001 |
| Mittelstück asymmetrisch | 0 | 0 | N | N | * |
| Mittelstück gebrochen | 0,64 | 0,86 | N | N | 0,255 |
| Mittelstück verdickt/schmal | 0 | 0 | N | N | * |
| Summe Mittelstück | 0,64 | 0,86 | N | N | 0,255 |
| Hauptstück schleifenförmig | 1,78 | 19,86 | N | N | <0,0001 |

Ergebnisse

| | | | | | |
|---------------------------|------|-------|---|---|-------------------|
| Hauptstück gerollt | 0 | 0,42 | N | N | 0,999 |
| Hauptstück geknickt | 0,75 | 10,61 | N | N | 0,00167 |
| Hauptstück gebrochen | 0 | 0,33 | N | N | 0,997 |
| Summe Hauptstück | 2,53 | 31,22 | N | N | <0,0001 |
| Plasmatropfen Hals | 0 | 1,06 | N | N | 1 |
| Plasmatropfen Mittelstück | 0,06 | 0,17 | N | N | 1 |
| Plasmatropfen Hauptstück | 0 | 0 | N | N | * |
| Summe Plasmatropfen | 0,06 | 1,22 | N | N | 1 |
| Einzelne Köpfe | 0,28 | 1,17 | N | N | 0,0153 |

4.7 Reproduzierbarkeit der Untersuchungsergebnisse bei unterschiedlichen Untersuchungstechniken und Untersuchern

Die Ergebnisse dieser Untersuchung werden zusammen mit der Differenz zwischen der Auswertung durch die Studenten und der eigenen Auswertung, in dieser Untersuchung der maßstabgebende „Goldstandard“, in den nachfolgenden Tabellen dargestellt (Tabelle 34 - 37).

Ergebnisse

Tabelle 34: Darstellung der Ergebnisse der mäanderförmigen Auswertung der Anzahl normaler Spermien (%) in mit Eosin gefärbten Präparaten durch Studenten im Vergleich zur eigenen Auswertung aufgeteilt in drei unterschiedlichen Ejakulate (1 = 20.08.2012, Volkus 1170 Pi; 2 = 15.10.2012, Riad NP 1093 Pi; 3 = 04.02.2013, Wamper NP 1118 Pi)

| Nr. | Ejakulat | Anzahl normaler Spermien (%) ausgewertet durch Studenten | Anzahl normaler Spermien (%) eigene Auswertung (Goldstandard) | Differenz |
|-----|----------|--|---|-----------|
| 1 | 1 | 72,5 | 80,5 | -8 |
| 3 | | 41 | 80 | -39 |
| 5 | | 86,5 | 83,5 | 3 |
| 7 | | 88 | 84 | 4 |
| 9 | | 75 | 78 | -3 |
| 11 | | 75 | 86,5 | -11,5 |
| 13 | | 89 | 84 | 5 |
| 15 | 2 | 78 | 82,5 | -4,5 |
| 17 | | 91,5 | 88,5 | 3 |
| 19 | | 87,5 | 83 | 4,5 |
| 21 | | 94 | 84,5 | 9,5 |
| 23 | | 87 | 82 | 5 |
| 25 | | 77,5 | 85 | -7,5 |
| 27 | | 91,5 | 85,5 | 6 |
| 29 | 3 | 93,5 | 89 | 4,5 |
| 31 | | 92,5 | 90,5 | 2 |
| 33 | | 89 | 88 | 1 |
| 35 | | 61,5 | 92 | -30,5 |
| 37 | | 95 | 87,5 | 7,5 |
| 39 | | 93,5 | 89 | 4,5 |

Ergebnisse

Tabelle 35: Darstellung der Ergebnisse der ungerichteten Auswertung der Anzahl normaler Spermien (%) in mit Eosin gefärbten Präparaten durch Studenten im Vergleich zur eigenen Auswertung aufgeteilt in drei unterschiedlichen Ejakulate (1 = 20.08.2012, Volkus 1170 Pi; 2 = 15.10.2012, Riad NP 1093 Pi; 3 = 04.02.2013, Wamper NP 1118 Pi)

| Nr. | Ejakulat | Anzahl normaler Spermien (%) ausgewertet durch Studenten | Anzahl normaler Spermien (%) eigene Auswertung (Goldstandard) | Differenz |
|-----|----------|--|---|-----------|
| 2 | 1 | 89 | 80,5 | 8,5 |
| 4 | | 74,5 | 80 | -5,5 |
| 6 | | 91 | 83,5 | 7,5 |
| 8 | | 68 | 84 | -16 |
| 10 | | 88,5 | 78 | 10,5 |
| 12 | | 76 | 86,5 | -10,5 |
| 14 | 2 | 79 | 84 | -5 |
| 16 | | 91,5 | 82,5 | 9 |
| 18 | | 75 | 88,5 | -13,5 |
| 20 | | 90 | 83 | 7 |
| 22 | | 86,5 | 84,5 | 2 |
| 24 | | 95 | 82 | 13 |
| 26 | | 94 | 85 | 9 |
| 28 | | 90 | 85,5 | 4,5 |
| 30 | 3 | 76 | 89 | -13 |
| 32 | | 81 | 90,5 | -9,5 |
| 34 | | 86,5 | 88 | -1,5 |
| 36 | | 89 | 92 | -3 |
| 38 | | 69 | 87,5 | -18,5 |
| 40 | | 92 | 89 | 3 |

Ergebnisse

Tabelle 36: Darstellung der Ergebnisse der mäanderförmigen Auswertung der Anzahl normaler Spermien (%) in mit Hemacolor® gefärbten Präparaten durch Studenten im Vergleich zur eigenen Auswertung aufgeteilt in drei unterschiedlichen Ejakulate (1 = 20.08.2012, Volkus 1170 Pi; 2 = 15.10.2012, Riad NP 1093 Pi; 3 = 04.02.2013, Wamper NP 1118 Pi)

| Nr. | Ejakulat | Anzahl normaler Spermien (%) ausgewertet durch Studenten | Anzahl normaler Spermien (%) eigene Auswertung (Goldstandard) | Differenz |
|-----|----------|--|---|-----------|
| 1 | 1 | 90,5 | 87,5 | 3 |
| 3 | | 72,5 | 86 | -13,5 |
| 5 | | 89,5 | 80 | 9,5 |
| 7 | | 93 | 79,5 | 13,5 |
| 9 | | 80,5 | 85 | -4,5 |
| 11 | | 65 | 76 | -11 |
| 13 | | 95,5 | 89,5 | 6 |
| 15 | 2 | 83 | 83 | 0 |
| 17 | | 97 | 96 | 1 |
| 19 | | 94 | 80,5 | 13,5 |
| 21 | | 94 | 89,5 | 4,5 |
| 23 | | 79,5 | 77 | 2,5 |
| 25 | | 60,5 | 80 | -19,5 |
| 27 | | 96,5 | 82,5 | 14 |
| 29 | 3 | 92,5 | 90,5 | 2 |
| 31 | | 96 | 87 | 9 |
| 33 | | 78,5 | 91,5 | -13 |
| 35 | | 78 | 90 | -12 |
| 37 | | 89,5 | 92 | -2,5 |
| 39 | | 70 | 84,5 | -14,5 |

Ergebnisse

Tabelle 37: Darstellung der Ergebnisse der ungerichteten Auswertung der Anzahl normaler Spermien (%) in mit Hemacolor® gefärbten Präparaten durch Studenten im Vergleich zur eigenen Auswertung aufgeteilt in drei unterschiedlichen Ejakulate (1 = 20.08.2012, Volkus 1170 Pi; 2 = 15.10.2012, Riad NP 1093 Pi; 3 = 04.02.2013, Wamper NP 1118 Pi)

| Nr. | Ejakulat | Anzahl normaler Spermien (%) ausgewertet durch Studenten | Anzahl normaler Spermien (%) eigene Auswertung (Goldstandard) | Differenz |
|-----|----------|--|---|-----------|
| 2 | 1 | 81 | 87,5 | -6,5 |
| 4 | | 83 | 86 | -3 |
| 6 | | 92,5 | 80 | 12,5 |
| 8 | | 85 | 79,5 | 5,5 |
| 10 | | 96,5 | 85 | 11,5 |
| 12 | | 90,5 | 76 | 14,5 |
| 14 | 2 | 77,5 | 89,5 | -12 |
| 16 | | 93 | 83 | 10 |
| 18 | | 41,5 | 96 | -54,5 |
| 20 | | 92 | 80,5 | 11,5 |
| 22 | | 88 | 89,5 | -1,5 |
| 24 | | 88,5 | 77 | 11,5 |
| 26 | | 90 | 80 | 10 |
| 28 | | 98,5 | 82,5 | 16 |
| 30 | 3 | 71 | 90,5 | -19,5 |
| 32 | | 83 | 87 | -4 |
| 34 | | 93,5 | 91,5 | 2 |
| 36 | | 88,5 | 90 | -1,5 |
| 38 | | 88 | 92 | -4 |
| 40 | | 84 | 84,5 | -0,5 |

Ergebnisse

Um die ausgeprägten Schwankungen der studentischen Ergebnisse besser darstellen zu können, wurde die Spannweite (R) zwischen den einzelnen Differenzwerten zwischen der Anzahl normaler Spermien bei einer Auswertung durch Studenten im Vergleich zur eigenen Auswertung errechnet. Es wird deutlich, dass die Werte auch innerhalb einer Färbung und Untersuchungsmethode so stark voneinander abweichen, dass keine Rückschlüsse auf die Effektivität der Methode bzw. Färbung möglich sind. Beispielsweise beträgt die Spannweite zwischen den einzelnen Differenzwerten bei dem mit Eosin gefärbtem und mäanderförmig ausgewerteten Ejakulat Nr. 1 50,5, bei Ejakulat Nr. 2 17 und bei Ejakulat Nr. 3 38 (Tabelle 38).

Tabelle 38: Spannweite (R) zwischen den einzelnen Differenzwerten der Anzahl normaler Spermien bei einer Auswertung durch Studenten im Vergleich zur eigenen Auswertung aufgeteilt in die drei unterschiedlichen Ejakulate (1 = 20.08.2012, Volkus 1170 Pi; 2 = 15.10.2012, Riad NP 1093 Pi; 3 = 04.02.2013, Wamper NP 1118 Pi) bzw. Färbungs- und Auswertungsmethode (EM = Eosin mäanderförmig, EU = Eosin ungerichtet, HM = Hemacolor® mäanderförmig, HU= Hemacolor® ungerichtet)

| Ejakulat | EM | EU | HM | HU |
|----------|----|------|------|------|
| 1 | 44 | 26,5 | 27 | 21 |
| 2 | 17 | 26,5 | 33 | 70,5 |
| 3 | 38 | 19,5 | 23,5 | 21,5 |

Die Ergebnisse der Studenten sind sowohl bei der mäanderförmigen als auch bei der ungerichteten Untersuchung deutlich abweichend von den eigenen Resultaten. Die Werte für die Anzahl normaler Spermien (%) sind teilweise wesentlich kleiner und teilweise wesentlich größer als der Goldstandard. Für die nachfolgende Auswertung wurde der Wert der Abweichung ohne die Ausprägungsrichtung berücksichtigt, sodass ab hier der Betrag der Differenz verwendet wurde. Die Box-and-Whisker-Plots in Abbildung 27 zeigen die Verteilung der Differenz zwischen eigener und studentischer Auswertung übergreifend über alle drei Ejakulate.

Ergebnisse

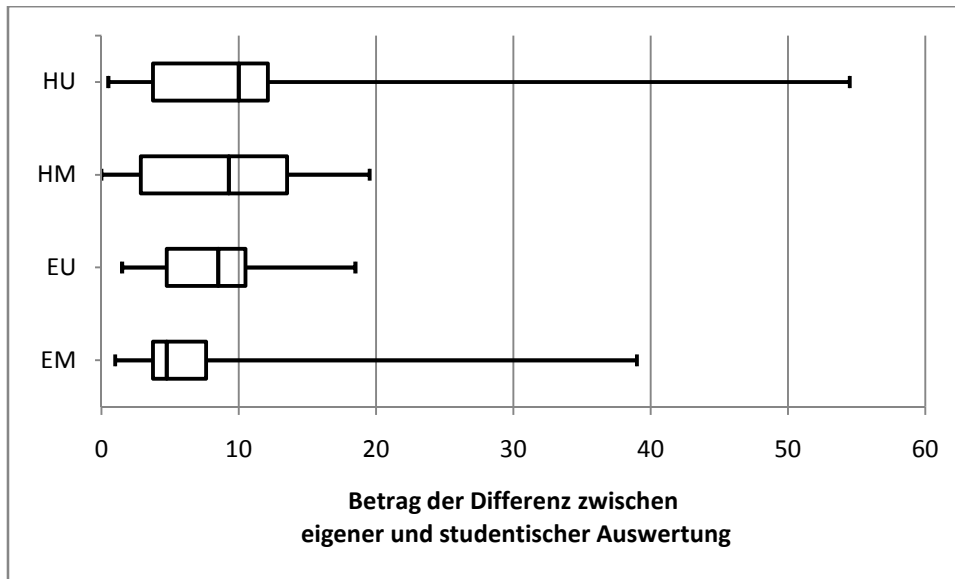


Abbildung 27: Darstellung des Medians, oberes und unteres Quartil und Minimal- und Maximalwert des Betrages der Differenz zwischen eigener Auswertung und studentischer Auswertung unterteilt in mäanderförmiges und ungerichtetes Vorgehen jeweils mit Eosin und Hemacolor® gefärbt (EM = Eosin mäanderförmig, EU = Eosin ungerichtet, HM = Hemacolor® mäanderförmig, HU = Hemacolor® ungerichtet)

Die folgenden Abbildungen 28 - 30 zeigen die gleiche Darstellung unterteilt in die unterschiedlichen Ejakulate.

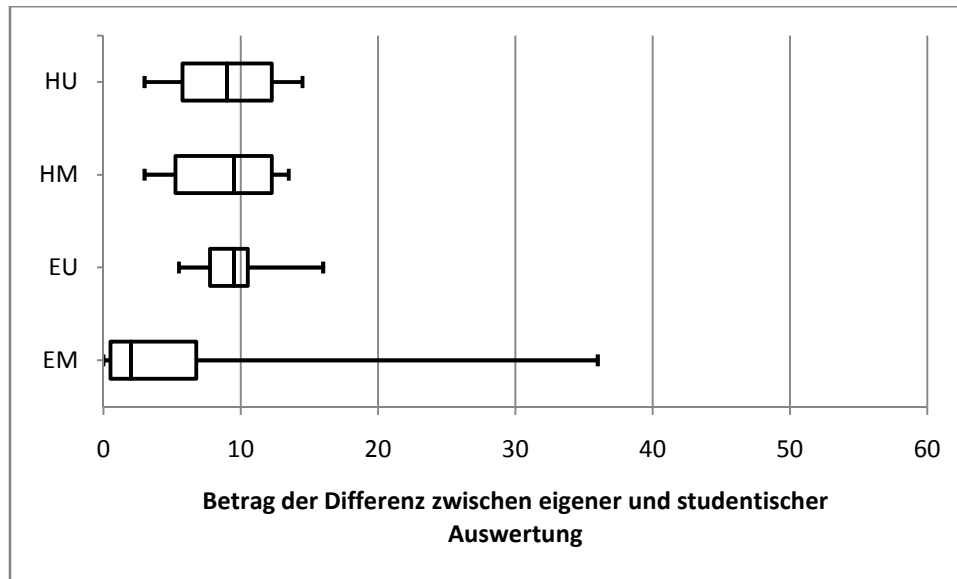


Abbildung 28: Ejakulat 1 - Darstellung des Medians, oberes und unteres Quartil und Minimal- und Maximalwert des Betrages der Differenz zwischen eigener Auswertung und studentischer Auswertung unterteilt in mäanderförmiges und ungerichtetes Vorgehen jeweils mit Eosin und Hemacolor® gefärbt (EM = Eosin mäanderförmig, EU = Eosin ungerichtet, HM = Hemacolor® mäanderförmig, HU = Hemacolor® ungerichtet)

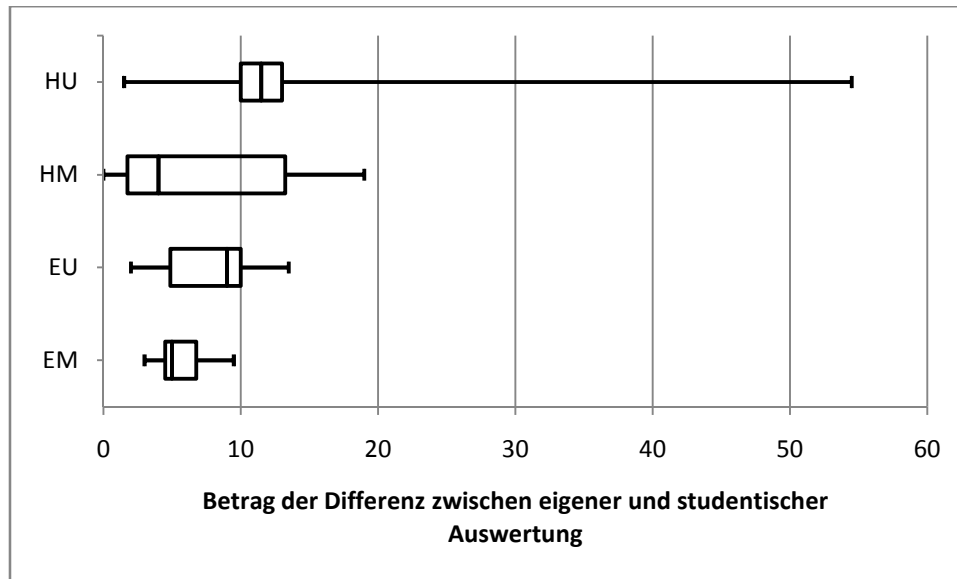


Abbildung 29: Ejakulat 2- Darstellung des Medians, oberes und unteres Quartil und Minimal- und Maximalwert des Betrages der Differenz zwischen eigener Auswertung und studentischer Auswertung unterteilt in mäanderförmiges und ungerichtetes Vorgehen jeweils mit Eosin und Hemacolor® gefärbt (EM = Eosin mäanderförmig, EU = Eosin ungerichtet, HM = Hemacolor® mäanderförmig, HU = Hemacolor® ungerichtet)

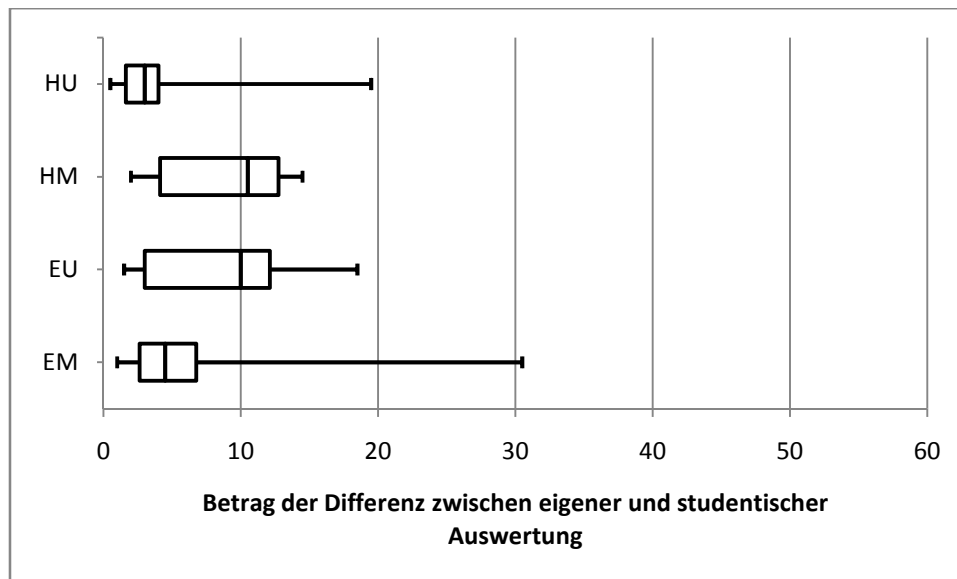


Abbildung 30: Ejakulat 3- Darstellung des Medians, oberes und unteres Quartil und Minimal- und Maximalwert des Betrages der Differenz zwischen eigener Auswertung und studentischer Auswertung unterteilt in mäanderförmiges und ungerichtetes Vorgehen jeweils mit Eosin und Hemacolor® gefärbt (EM = Eosin mäanderförmig, EU = Eosin ungerichtet, HM = Hemacolor® mäanderförmig, HU = Hemacolor® ungerichtet)

Es wurde auf eine weitere statistische Auswertung der Ergebnisse und Bestimmung der statistischen Signifikanz verzichtet. Aufgrund der Rohdaten war bereits ersichtlich, dass die starken Schwankungen der Ergebnisse der Studenten untereinander und gegenüber dem Goldstandard dazu führen, dass keine Rückschlüsse auf die untersuchte Methodik gezogen werden können.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Fragestellung

In der Ferkelproduktion hat sich die instrumentelle Besamung der Sauen mit flüssigkonserviertem Ebersperma durchgesetzt. Die Qualität des in den Verkehr zu bringenden Samens wird vor dem Verkauf sorgfältig durch die Besamungsstation überprüft. Dabei spielt die Morphologie und die Vitalität der einzelnen Samenzellen neben ihrer Motilität, der Dichte des Ejakulates und dem hygienischen Status eine große Rolle für den Besamungserfolg. Beim Eber darf der prozentuale Anteil morphologisch veränderter Samenzellen mit Plasmotropfen 25 % und ohne Plasmotropfen 20 % der gesamten Samenzellen nicht überschreiten (Busch und Holzmann, 2001). Der Grund dafür ist, dass ein hoher Anteil morphologisch veränderter Samenzellen die Motilität negativ beeinflusst (Bach et al., 1982). Zusätzlich sind auch die Befruchtungsergebnisse beim Einsatz von Ebersperma mit morphologisch stark veränderten Samenzellen schlechter, weil sowohl die Trächtigkeitsrate als auch die Wurfgröße mit steigendem Anteil morphologisch veränderter Spermien sinken (Stemmler et al., 1982).

In einer nativ auf dem Objektträger ausgestrichenen Samenzellprobe lässt sich lichtmikroskopisch auf Grund von schlechtem Kontrast gegenüber dem farblosen Hintergrund und fehlender Detailerkennbarkeit die Morphologie der einzelnen Samenzelle nur eingeschränkt bewerten. Um die einzelne Samenzelle und eventuelle Abweichungen von der morphologischen Norm im Lichtmikroskop deutlicher erkennen zu können, kann sie mit unterschiedlichen Farbstoffen angefärbt werden.

In der vorliegenden Arbeit sollen die vielen verschiedenen sich in der Anwendung befindenden Färbemethoden für Samenzellen hinsichtlich der Darstellung der Morphologie und der Vitalität der einzelnen Samenzelle, des finanziellen und zeitlichen Aufwandes und der Lagerfähigkeit der Ausstriche miteinander verglichen werden, um die Beurteilung von flüssigkonserviertem

Ebersperma in der Besamungsstation zu vereinfachen und gleichzeitig eine hohe Qualität zu sichern.

Zusätzlich wurde ein Versuch durchgeführt, um die Frage zu beantworten, ob die Untersuchungsergebnisse der gefärbten Ausstriche abhängig von der Erfahrung des Untersuchers und der Art der Durchmusterung des gefärbten Präparates sind.

Keine Berücksichtigung fanden komplexere Methoden der Samenzelluntersuchung, wie das Anfärben der Samenzellen mit Fluoreszenzfarbstoffen oder Färbungen der Nukleinsäuren. Diese Methoden erfordern eine spezifische Ausrüstung und werden in der Regel nicht in der Routinediagnostik verwendet.

5.2 Diskussion der Methodik

Die verwendeten Samenzellproben wurden von der kommerziellen Besamungsstation Darmstadt/Griesheim der Zucht- und Besamungsunion Hessen eG aus den zum freien Verkauf stehenden Material bestellt, um möglichst praxisrelevantes Material für die Untersuchung zur Verfügung zu haben. Es wurde mit BTS Gentamycin Verdünner behandelten flüssigkonservierten Samenportionen gearbeitet. Die Eber gehörten den Rassen Pietrain und Deutsche Landrasse an. Um die Effizienz der Färbemethoden zu vergleichen, erfolgte zusätzlich zur Beurteilung der Darstellung der Pathomorphologie bei den einzelnen Färbemethoden die genaue Dokumentation des zeitlichen und finanziellen Aufwandes. Es wurde die durchschnittliche Arbeitszeit zur Anfertigung eines gefärbten Präparates festgehalten. Die Gesamtzeit ergibt sich aus der Zeit zur Herstellung bis zur Auswertbarkeit des Präparates (Herstellungszeit) und der Dauer der Auswertung (Auswertungszeit) eines Präparates. Die Herstellungszeit setzt sich sowohl aus der Dauer der Anfertigung des Präparates, als auch aus der Wartezeit, bis das angefertigte Präparat ausgewertet werden kann, zusammen. Teilweise treten sehr lange Wartezeiten bei einzelnen Färbemethoden, beispielsweise zur Trocknung eines gefärbten Präparates, auf und führen zu außergewöhnlich langen Herstellungszeiten. Die Dokumentation der

Auswertungszeit ist unter anderem auch bei der Unterscheidung von Färbungen, die in der 400fachen Vergrößerung bzw. 1000fachen Vergrößerung betrachtet werden, von Bedeutung. In der größeren Vergrößerung können wesentlich weniger Samenzellen pro Gesichtsfeld beurteilt werden und dementsprechend wird ein längerer Auswertungszeitraum benötigt, um 200 Samenzellen zu beurteilen. Bei einer kleineren Vergrößerung, bei der mehr Samenzellen pro Gesichtsfeld sichtbar sind, ist die Beurteilung von 200 Samenzellen schneller abgeschlossen. Infolge der geringen Abweichungen der gemessenen Zeiten bei den standardisierten und geübten Färbungsabläufen und mikroskopischen Auswertungen, wurde bei der Untersuchung der Proben 6 bis 12 auf die genaue Dokumentation der Zeit verzichtet.

Der Vergleich des finanziellen Aufwandes erfolgte, indem die Kosten pro gefärbten Objektträger erfasst wurden. Zusätzlich ermöglicht diese Art des Vergleiches für die Besamungsstationen eine einfache Umrechnung der Kosten auf den eigenen täglichen Bedarf und die dabei mögliche Kosteneinsparung für die einzelne Färbemethode. Dabei wurden Hilfsmittel wie Mikroskop und Pipetten nicht berücksichtigt, da sie zur Anfertigung und Untersuchung von allen Präparaten notwendig sind und zur Grundausstattung eines Samenlabors gehören.

Hinzu kommt, dass die Kosten in Relation zum zeitlichen Aufwand für die Anfertigung der einzelnen Färbungen und die Auswertung gesehen werden müssen. Eine deutlich verlängerte Arbeitszeit bedeutet erhöhte Kosten, weil eine Arbeitskraft für eine preisgünstige aber äußerst zeitintensive Färbemethode länger beschäftigt ist. Es wurde mit dem durchschnittlichen Stundenlohn von 8,65 € einer Tiermedizinischen Fachangestellten, berechnet bei einer 40-Stunden-Woche mit einem monatlichen Gehalt von 1500 €, gerechnet. Bei dieser Beurteilung sollte allerdings bedacht werden, dass die hier berechneten Kosten anhand des kompletten Arbeitsaufwandes, d. h. Herstellungszeit plus Auswertungszeit, erstellt wurden. Die auswertende Fachkraft hat allerdings teilweise auf Grund von langen Wartezeiten zwischen den einzelnen Schritten bei der Anfertigung und Auswertung eines gefärbten Präparates die Möglichkeit, in der Wartezeit andere Aufgaben zu erledigen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neun verschiedene, zum größten Teil bereits etablierte Methoden, ausgewählt. Diese, sich zur Färbung von Samenzellen

bereits in der Verwendung befindlichen Färbemethoden, wurden miteinander verglichen. Ein Teil der Färbelösungen sind kommerziell erhältliche Zusammenstellungen (Diff-Quick®, Hemacolor®, Sangodiff-G®, Spermac®, Testsimplets®, Methyl-Violett), die bereits in der Klinik für Gynäkologie, Andrologie und Geburtshilfe verwendet oder eigens für diese Arbeit angeschafft wurden. Die Färbung und Auswertung dieser Methoden erfolgte nach den Hinweisen in den jeweiligen Produktinformationen. Die restlichen Färbelösungen wurden auf der Grundlage von in der Literatur verwendeten Inhaltsangaben und Herstellungsvorgängen erstellt. Bei der Färbung mit Eosin wurde die in Lehrbüchern gängige Ausstrichmethode mit einer 2%ige Farbstofflösung aus 2 g Eosin B und 3 g Natriumcitrat ad 100 ml Aqua dest. verwendet (Busch und Holzmann, 2001; Busch und Waberski, 2007; Hoffmann, 2003). Die Herstellung einer Eosin-Nigrosin-Färbelösung erfolgte nach der Zusammensetzung von Dott und Foster (1972). Allerdings wurde nicht das Farb-Sperma-Verhältnis von 8 : 1 Tropfen von Dott und Foster (1972), sondern 1 - 2 : 1 aus der Anwendung in der humanen Samenuntersuchung (World Health Organisation, 2010) verwendet, um ein intensiveres Färbeergebnis zu erhalten. Zur Färbung der Samenzellen mit Formolcitrat-Bengalrosa wurde die Zusammenstellung von Riesenbeck et al. (2001) verwendet. In dieser Studie wurde zwar mit Rüdensperma gearbeitet, allerdings ist speziell für Ebersperma in der Literatur keine Zusammenstellung zu finden.

Die Beurteilung der Morphologie erfolgte am gefärbten Präparat mikroskopisch durch die Auszählung von 200 Spermien (Busch und Waberski, 2007) mit einem elektronischen Zählgerät, das direkt den prozentualen Anteil an der Gesamtmenge berechnet. Die Untersuchung der Pathomorphologie erfolgte nach den Vorgaben der Untersuchung von menschlichen Samenzellen aus dem „WHO laboratory manuel for examination and processing of human semem“ (2010), angepasst an die Erkenntnisse zur Pathomorphologie von Eberspermien nach „The morphology of boar spermatozoa“ von Hancock (1956). Um die grundsätzlichen Eigenschaften der jeweiligen Färbemethoden miteinander vergleichen zu können, wurde jede Färbung zu jedem untersuchten Zeitpunkt bezüglich der grundsätzlichen Parameter Färbeintensität, Schärfe, Detailerkennbarkeit, Kontrast und Hintergrund beurteilt. Durch die Auswertung

dieser Kriterien durch den immer gleichbleibenden Untersucher wurde versucht, die grundsätzliche Subjektivität dieser Kriterien so klein wie möglich zu halten. Nur zwei der neun Färbungen eignen sich zusätzlich zur pathomorphologischen Untersuchung zur Beurteilung der Vitalität der zu untersuchenden Samenprobe. Deutlich erschwert wird der Vergleich dadurch, dass mit Eosin gefärbte Samenzellen standardmäßig in der 400fachen Vergrößerung und mit Eosin-Nigrosin gefärbte Samenzellen in der 1000fachen Vergrößerung mit Immersionsöl untersucht werden. Dies ist allerdings in den gängigen Durchführungsprotokollen für Eosin (Busch und Holzmann, 2001; Busch und Waberski, 2007; Hoffmann, 2003) und Eosin-Nigrosin (Dott und Foster, 1972, World Health Organisation, 2010) beschrieben.

In dieser Studie wurden die von der Besamungsstation Darmstadt/Griesheim der Zucht- und Besamungsunion Hessen eG bestellten Samenportionen über Nacht bei drei verschiedenen Temperaturen gelagert, um zu testen, ob diese differenten präanalytischen Bedingungen Einfluss auf die Färbung haben. Zudem sollte durch die absichtliche Schädigung der Samenzellen durch suboptimale Lagerungsbedingungen die Qualität der Färbungen an vorgeschädigten Samenzellen überprüft werden.

Der größte Anteil der weltweit durchgeführten Besamungen findet mit flüssigkonserviertem Ebersperma am Tag der Samenabnahme oder nach 1 - 5 Tagen gelagert bei 15 - 18°C statt. Die Lagerung bei niedrigeren Temperaturen unter 15°C, besonders von frisch gewonnenem Ebersperma, führt zu einem auffälligen Anstieg der Anzahl der nicht vitalen Samenzellen eines Ejakulates (Paulenz et al., 1995). Herausragend ist, dass Eberspermien wesentlich empfindlicher auf den Temperaturabfall reagieren als Bullenspermien. Die weltweit verbreitete Methode der Lagerung von Bullensperma ist die Tiefgefrierkonservierung und Lagerung bei -196°C in flüssigem Stickstoff, welche bei Eberejakulat auf Grund der unterschiedlichen Membranzusammensetzung der Samenzellen nicht als Lagerungsmethode in Frage kommt. Tiefgefrorenes Ebersperma eignet sich wegen der daraus resultierenden erniedrigten Abferkelrate und Wurfgröße nicht für die Verwendung in der Schweinezucht zur Ferkelproduktion, sondern lediglich für den weltweiten Transport und die Archivierung von genetischem Material (Johnson et al., 2000). Infolge dieser bekannten Kälteempfindlichkeit wurde ein

Drittel des Samenmaterials bei 6°C im Kühlschrank aufbewahrt, ein weiteres Drittel bei der bevorzugten Temperatur von 17 - 18°C und das restliche Material bei 38°C im Wasserbad gelagert.

Zur Dokumentation der Morphologie des Samens eines Ebers kann es unter Umständen aus forensischen Gründen notwendig sein, ein gefärbtes Präparat über einen längeren Zeitpunkt aufzubewahren. Auch nach dieser Zeit sollte die Auswertung noch zuverlässig erfolgen können und das Ergebnis sollte keine Veränderungen gegenüber dem Ausgangsergebnisse auf Grund des Qualitätsverlustes der Färbung aufweisen. Daher wurden zusätzlich zur Erstuntersuchung direkt nach der Färbung (ZP 1), die gefärbten Ausstriche nach einem Tag (ZP 2), nach einer Woche (ZP 3) und nach drei Monaten (ZP 4) erneut untersucht. Es wurden die gleichen Parameter wie bei der Erstuntersuchung erfasst. Bisher finden sich in der Literatur keine Angaben über die Lagerungsfähigkeit gefärbter Ausstriche.

Ziel der Arbeit war es weiterhin zu erkennen, ob Unterschiede in der Auswertung durch unterschiedliche Untersucher unter besonderer Berücksichtigung der Auswertungstechnik bestehen. Um einen möglichst repräsentativen Eindruck von einem mikroskopischen Ausstrich zu bekommen und Doppelzählungen zu vermeiden, sollte die Untersuchung des Ausstriches mäanderförmig erfolgen. Zur Darstellung der Bedeutung dieser Untersuchungsart haben im 10. Semester befindliche Tiermedizinstudenten im Rahmen des Spermatologischen Kurses die Ausstriche teilweise mäanderförmig und teilweise ungerichtet untersucht. Diese Untersuchung erfolgte an drei verschiedenen Tagen und drei unterschiedlichen Samenzellproben, die im Vorfeld alle durch die gleiche Person ausgestrichen und gefärbt wurden, um möglichst homogenes Untersuchungsmaterial zu produzieren. Die Auswertung wurde mit den Färbungen Eosin und Hemacolor® durchgeführt, weil sich diese Färbemethoden im Rahmen der Voruntersuchungen als geeignet dargestellt haben. Alle Studenten haben freiwillig an diesem Versuch teilgenommen. Die Untersuchungen der Studenten wurden mit den eigenen Ergebnissen als „Goldstandard“ verglichen. Auf eine Einteilung in die Parameter Färbeintensität, Schärfe des Bildes, Detailerkennbarkeit und Kontrast in „blass/schlecht“, „mäßig“, „gut“, „intensiv/deutlich“ wurde verzichtet, da die Skalierung dieser Parameter zu sehr

von der Subjektivität der Untersucher und mangelnder Untersuchungserfahrung beeinflusst wird. Allerdings wurde auch in der Auszählung der morphologisch veränderten Samenzellen sehr deutlich, dass den Untersuchern das Training in der Beurteilung der korrekten bzw. nicht korrekten Morphologie von Samenzellen fehlt.

Es wurde abschließend auf eine genauere statistische Auswertung der Ergebnisse verzichtet, weil aufgrund der Rohdaten bereits ersichtlich ist, dass die starken Schwankungen der Ergebnisse der Studenten untereinander und gegenüber der eigenen Auswertung dazu führen, dass keine Rückschlüsse auf die Vor- und Nachteile der zu untersuchenden Methodik möglich sind.

5.3 Diskussion der Ergebnisse

5.3.1 Vergleich des zeitlichen Aufwandes

Der Vergleich der Arbeitszeiten zur Herstellung und Beurteilung eines Samenzellpräparates wird in Tabelle 6 dargestellt. Die Tabelle zeigt eine Spanne von 59,5 Min. zwischen der schnellsten Färbung Eosin (8,17 Min. \pm 23,2 Sek.) und der zeitintensivsten Methode Testsimplets® (67,67 Min. \pm 19,84 Sek.). Diese große Spanne resultiert hauptsächlich aus der Wartezeit, die verstreicht bis sich die Samenzellköpfe in der Flüssigkeit flach gelagert haben, wenn der Samen tropfenförmig auf einen Objektträger aufgetragen und nicht ausgestrichen wird. Bei den Färbungen Methyl-Violett und Formolcitrat-Bengalrosa treten ebenso Wartezeiten von mindestens 60 bzw. 45 Minuten im Verlauf der Anfertigung eines beurteilbaren Präparates auf. Diese Wartezeiten können, wenn es die Arbeitsabläufe eines Labors zulassen, eventuell für andere Tätigkeiten genutzt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Auswertungszeit sich grundsätzlich zwischen den Färbungen, die in der 400fachen Vergrößerung (Eosin, Diff-Quick®, Hemacolor®, Sangodiff-G®, Methyl-Violett), und denen, die in der 1000fachen Vergrößerung (Eosin-Nigrosin, Spermac®, Formolcitrat- Bengalrosa, Testsimplets®) beurteilt werden, unterscheidet. Die Auswertung in der 1000fachen Vergrößerung dauert durchschnittlich 1,84 Minuten länger als die Beurteilung in der 400fachen Vergrößerung. Der Grund dafür ist, dass in beiden Fällen 200 Spermien pro Auswertungsvorgang beurteilt werden müssen.

Die Differenz zwischen der Herstellungszeit eines mit Eosin (3,17 Min. \pm 10,42 Sek.) und mit Eosin-Nigrosin (3,67 Min. \pm 10,42 Sek.) gefärbten Präparates erklärt sich durch die 30 Sekunden Wartezeit zwischen Vermischung des Farb- und des Spermatropfen und des Ausstrichvorganges. Die Zeit zur zusätzliche Beurteilung der Vitalität ist bei den Färbungen Eosin und Eosin-Nigrosin unabhängig von der Gesamtzeit angegeben, weil diese Methoden die zusätzliche Information über die Anzahl der lebenden Samenzellen im Ausstrich enthalten, die die anderen Färbemethoden nicht geben können.

Für die Herstellung eines mit Diff-Quick® gefärbten Präparates (5,73 Min. \pm

11,97 Sek.) wird mehr Zeit benötigt, weil zuerst ein Nativausstrich angefertigt wird, der im zweiten Arbeitsschritt fixiert und mit zwei verschiedenen Färbelösungen gefärbt wird. Es schließt sich ein Trocknungsvorgang an.

Die Färbung mit Hemacolor® (5,73 Min. \pm 15,28 Sek.) unterscheidet sich nur durch die Eintauchzeiten von der Färbung mit Diff-Quick®. Die restlichen Herstellungs- und Auswertungszeiten unterscheiden sich zwischen den Färbungen nicht.

Sowohl die Zeitspanne, die vom Hersteller bis zur Beurteilung eines gefärbten Präparates angegeben werden, als auch zwischen der angegebenen Wartezeit und der in dieser Arbeit erfolgten Zeitmessung liegen bei einigen Färbemethoden große Unterschiede. Bei der Färbung mit Formolcitrat-Bengalrosa wird eine Wartezeit von 30 Minuten vom Hersteller beschrieben. Eigene Zeitmessungen ergaben 45 Minuten. Mit Testsimplets® angefärbte Samenzellpräparate benötigen laut Herstellerangaben eine Wartezeit von 5 bis 15 Minuten. Bei der Zeitmessung im Rahmen dieser Arbeit wurden mindestens eine bis zu drei Stunden erfasst bis das gefärbte Präparat auswertbar war. Ebenso verhält es sich bei der Färbung mit Methyl-Violett. Die Wartezeit sollte 10 Minuten betragen, erstreckt sich allerdings ebenso wie bei den anderen beiden Färbungen über eine deutlich längere Zeit. Eine mögliche Erklärung findet sich in der sehr verbreiteten, aber ungenauen Maßeinheit „Tropfen“. Ein Milliliter einer wässrigen Lösung enthält 15 bis 20 Tropfen. Folglich besteht ein Tropfen aus 0,05 bis 0,07 ml Flüssigkeit. Die Tropfengröße ist abhängig von der Flüssigkeit selber, der Form der Öffnung während der Dosierung und der Adhäsion der Flüssigkeit an der Pipette (Stewart, 1996). Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht mit einer Pipette einen möglichst kleinen Tropfen zu verwenden, um den Trockenvorgang möglichst kurz zu halten. Trotzdem wurden die oben genannten Zeiten benötigt.

5.3.2 Vergleich des finanziellen Aufwandes

Zwischen den Gesamtkosten der günstigsten Färbung Formolcitrat-Bengalrosa und der teuersten Methode Testsimplets® liegen eine Differenz von 1,55 € pro gefärbten Objektträger. Grundsätzlich stellte sich heraus, dass auf der Grundlage von in der Literatur verwendeten Herstellungsangaben selbst

hergestellte Färbelösungen (Formolcitrat-Bengalrosa, Eosin, Eosin-Nigrosin) preiswerter sind, als kommerziell erhältliche Zusammenstellungen (Diff-Quick®, Hemacolor®, Sangodiff-G®, Spermac®, Testsimplets®). Eine Ausnahme stellt die kommerziell hergestellte Spermafarbe Methyl-Violett von BEG Schulze und Bremer mit 0,17 € Gesamtkosten pro gefärbten Objektträger dar. Im Rahmen dieser Auswertung wurde nicht berücksichtigt, dass bei der Abnahme größerer Mengen im Handel der Preis für die Reagenzien bzw. Färbekits und dadurch auch für den einzelnen gefärbten Objektträger möglicherweise geringer wird.

Bei Berücksichtigung der Arbeitszeit ergibt sich für die Kosten der Färbemethoden ein differentes Bild. Die günstigste Färbemethode ist in diesem Fall Eosin auf Grund der kurzen Arbeitszeit (8,17 Min. ± 23,2 Sek.) und günstigen Materialkosten von 0,19 € pro gefärbten Objektträger. Testsimplets® ist auf Grund der langen Arbeitszeit (67,67 Min. ± 19,84 Sek.) und hohen Materialkosten von 1,70 € pro gefärbten Ausstrich die teuerste Färbemethode. Deutlich zeigt sich, dass die bereits wegen ihrer hohen Zeitintensivität aufgefallenen Färbemethoden Formolcitrat-Bengalrosa, Testsimplets® und Methyl-Violett in dieser Wertung unter Berücksichtigung der Personalkosten am teuersten sind. Es muss jedoch auch hier bedacht werden, dass es sich bei diesen Färbemethoden nicht nur um Arbeitszeit, sondern auch um Wartezeiten handelt, die für andere Tätigkeiten genutzt werden können. Die Materialkosten für ein mit Hemacolor® gefärbtes Präparat können je nach gewünschter Farbintensität zwischen 0,46 € und 1,36 € variieren, was eine Einordnung in die aufsteigend sortierte Rangliste schwierig macht.

5.3.3 Auswertung der einzelnen Färbemethoden

Bei der Literaturrecherche wurde bereits deutlich, dass Eosin für die Färbung von tierischen Samenzellen und die Beurteilung der Vitalität und Pathomorphologie von tierischen Samenzellen die gängigste, in den meisten Lehrbüchern beschriebene, Färbemethode ist. Die häufigste, und auch im Rahmen dieser Arbeit verwandte Ausführung der Eosinfärbung, ist der Ausstrich des Spermas zusammen mit der Färbelösung (Busch und Holzmann, 2001; Busch und Waberski, 2007; Hoffmann, 2003). Die mit Eosin gefärbten Präparate zeigen zum Zeitpunkt 1 eine mäßige Farbintensität im Vergleich zu

wesentlich farbintensiveren Methoden wie Spermac® oder Formolcitrat®, eine gute Detailerkennbarkeit und einen guten Kontrast. Allerdings verschlechtern sich mit zunehmender Lagerungszeit die Detailerkennbarkeit und der Kontrast auf Grund von trocknungsbedingter Farbkristallbildung. Ebenso verliert das gefärbte Präparat mit der Zeit an Farbintensität. Trotz dieser Einschränkungen zu späteren Untersuchungszeitpunkten macht die solide Färbeleistung mit Eosin gefärbte Präparate zu allen vier Zeitpunkten beurteilbar. Die Beurteilung der Pathomorphologie mit Eosin gefärbter Präparate zeigte einen erhöhten Anteil morphologisch abweichender Samenzellen im Vergleich zum Durchschnitt der Färbemethoden. Besonders auffällig war eine gesteigerte Anzahl einzeln gelagerter Köpfe mit 3,83 % (arithmetischer Mittelwert 2,57 %) und gebrochene Mittelstücke mit 1,69 % (arithmetischer Mittelwert 0,95 %). Dies liegt vermutlich wie auch bei den Färbemethoden Eosin-Nigrosin, Diff-Quick®, Hemacolor®, Sangodiff-G® und Spermac® daran, dass die Samenzellen auf dem Objektträger vor der Färbung oder mit der Färbelösung zusammen ausgestrichen werden. Die Methoden Formolcitrat-Bengalrosa und Testsimplents® arbeiten mit aufgetropftem Sperma und erhalten im Ausstrich deutlich weniger einzelne Köpfe (FB = 1,58 %, TS = 1,08 %, Ø = 2,57 %), geknickte Hauptstücke (FB = 1,03 %, TS = 1,0 %, Ø = 1,96 %) und gebrochene Mittelstücke (FB = 0,28 %, TS = 0,31 %, Ø = 0,95 %).

Die Eosin-Nigrosin-Färbung stellt ebenso ein seit vielen Jahrzehnten bekanntes Verfahren dar (Blom, 1951) und wurde speziell für die Beurteilung von porcinen Samenzellen mehrfach beschrieben (Hancock, 1953; Retzius, 1909; Dott und Foster, 1975; Bamba, 1988; Tamuli und Watson, 1994; Tsakmakidis et al., 2010). Im Rahmen dieser Arbeit wiesen alle mit Eosin-Nigrosin gefärbten Präparate eine mäßige Farbintensität, eine deutliche Detailerkennbarkeit und einen deutlichen Kontrast auf. Wie auch bei der Färbung mit Eosin bilden sich nach über einem Tag Lagerung Trocknungsartefakte wie Kristallbildung und Streifen durch Zusammenziehen des Farb-Samenzellgemisches auf dem Objektträger. Durch die Untersuchung in der 1000fachen Vergrößerung und den verbesserten Kontrast durch die dunkle Hintergrundfärbung mit Nigrosin sind die Pathomorphologie und besonders Cytoplasmotropfen sehr gut zu erkennen. Das Akrosom wird durch diese Färbung allerdings nicht besonders hervorgehoben, wie bei der zusätzlichen Verwendung von Giemsa zur

Akrosomdarstellung. Bei der alleinigen Färbung mit Eosin-Nigrosin stellt sich das lebende Spermium ungefärbt und das tote Spermium matt pink mit einem schlecht abgrenzbaren Rand dar. Im Unterschied dazu würde sich bei der Eosin-Nigrosin-Giemsa-Kombination die postakrosomale Region bei der lebenden Samenzelle pink und bei der toten Samenzelle dunkel lila anfärben, sodass sich das Akrosom und seine Beschaffenheit gut von dem dunkel angefärbten postakrosomalen Bereich abhebt (Tamuli und Watson, 1994). Bei caninen und bovinen Samenzellen entstehen durch die hypotone Zusammensetzung von Eosin-Nigrosin vermehrt Schwanzdefekte wie aufgerollte und geknickte Spermischwänze (Freneau et al., 2010; Kustritz et al., 1998). Diese These konnte im Rahmen der hier erfolgten Untersuchung von porcinen Samenzellen nicht bestätigt werden. Bei der Färbung mit Eosin-Nigrosin traten übergreifend über die Lagerungstemperatur bei sofortiger Auswertung 9,81 % Hauptstückveränderungen (schleifenförmig, gerollt, geknickt, gebrochen) und durchschnittlich bei den anderen Färbungen mit 11,5 % deutlich mehr auf. Außerdem waren auf Grund der deutlichen Detailerkennbarkeit und Kontrast bei dieser Färbung ein auffällig hoher Anteil Plasmotropfen 10,33 % (arithmetischer Mittelwert 5,39 %) zu erkennen.

Die Färbung von porcinen Samenzellen mit der Diff-Quick® Färbelösung ist nicht gängig, wie die vorangegangene Literaturrecherche gezeigt hat. Die Anwendung an tierischen Samenzellen beschränkt sich auf Erfahrungen mit Affen- und Rotwildsperma (Gago et al., 1998; Soler et al., 2005) und wird ansonsten in der humanen Andrologie eingesetzt (Kruger et al., 1987). Bei der Gegenüberstellung mit der nach dem gleichen Prinzip funktionierenden Färbung Hemacolor® zeichnet sich Diff-Quick® durch die bessere, deutlichere Färbung, besonders der Samenzellköpfe, aus (Gago et al., 1998). Diese Tendenz konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Es konnte lediglich ein subjektiv festgestellter geringer Unterschied, der nicht deutlich genug ist, um sich in der Unterteilung der Farbintensität in die vier Kategorien „blass“, „mäßig“, „gut“ oder „intensiv“ niederzuschlagen. Beide Färbemethoden wurden im Vergleich zu den restlichen Färbungen mit „blass“ beurteilt. Mit Diff-Quick®-gefärbte Präparate sind zu allen vier Zeitpunkten auswertbar, allerdings ist die Färbequalität grundsätzlich und besonders die Farbintensität nach drei Monaten Lagerung erneut reduziert. Zusätzlich ist die Detailerkennbarkeit durch

Farbverlust und Artefakte eingeschränkt. Die beschriebene mäßige Detailerkennbarkeit und die blasse Farbintensität erklären den durchschnittlich geringeren Anteil an morphologisch abweichenden Spermien mit 22,56 %, hauptsächlich die weniger detektierten Kopf- und Akrosomveränderungen sowie Plasmotropfen. Die erhöhte Anzahl Mittelstückveränderungen und geknickte Hauptstücke im Vergleich zum durchschnittlichen Anteil bei allen Färbemethoden ist vermutlich erneut in der Ausstrichtechnik begründet.

Abgesehen von den bereits bei der Diskussion von den Färbeergebnissen mit Diff-Quick® genannten Eigenschaften, war bei der Färbung mit Hemacolor® besonders nach einer Lagerung von drei Monaten eine deutliche Verschlechterung der Färbequalität zu beobachten. Die stärkste Beeinträchtigung der Auswertung erfolgte bei einzelnen Präparaten einerseits durch Farbpartikelanlagerungen und andererseits komplett entfärbte gelbliche Bereiche. Zusätzlich wurden vermehrt gezackte Spermischwänze bemerkt, die ebenso wie einzelne Köpfe und geknickte Mittelstücke bei sofortiger Auswertung, ein Hinweis auf Druck beim Ausstrichverfahren oder ein trocknungsbedingtes Zusammenziehen sein könnten. Die pathomorphologische Untersuchung gelangt zu einem ähnlichen Ergebnis wie bei der Färbung mit Diff-Quick®. Auf Grund der mäßigen Färbequalität ist der Anteil morphologisch veränderter Samenzellen geringer als der Durchschnitt, weil weniger Kopf- und Akrosomveränderungen und Plasmotropfen erkannt wurden.

Sangodiff-G® ist eine selten angewendete kommerziell hergestellte Färbefolie, deren Gebrauch bisher nur bei menschlichen und nicht bei tierischen Samenzellen beschrieben ist. Wernicke und Schirren stellen schon 1982 Sangodiff-G® im Vergleich mit Testsimplets® auf Grund der Verwendung eines Fixiermittels als länger haltbar heraus. Diese tendenziell längere Auswertbarkeit, wobei beide Methoden im Gegensatz zu Eosin, Eosin-Nigrosin, Hemacolor®, Diff-Quick® und Spermac® grundsätzlich nur eingeschränkt auswertbar sind, konnte in dieser Untersuchung bestätigt werden. Grundsätzlich verfügten beide Färbungen nur über eine eingeschränkte Auswertbarkeit. Sangodiff-G® stellt sich im Vergleich mit Testsimplets® auf Grund der Verwendung eines Fixiermittels als länger haltbar heraus. Mit Sangodiff-G®-gefärbte Präparate waren bei den ersten beiden Auswertungen bis zu einen Tag nach der Färbung uneingeschränkt auswertbar. Im Gegensatz

dazu waren mit Testsimplets®-gefärbte Präparate schon am zweiten Tag nur noch zu 97,22 % auswertbar. Mit fortschreitender Lagerung steigerte sich der Unterschied zwischen den beiden Färbungen. Die Auswertbarkeit von Sangodiff-G® lag nach eine Woche bei 91,67 % und nach drei Monaten bei 55,56 %. Bei mit Testsimplets®-gefärbten Präparaten reduziert sie sich auf 72,22 % bzw. 11,11 %. Zwei Gründe für die verminderte Auswertbarkeit der mit Sangodiff-G®-gefärbten Präparate stellten die Ablagerung von körnigen Farbresten im Hintergrund der Samenzellen und der Farbverlust der gefärbten Spermien während der Lagerung dar. Der Vergleich der Ergebnisse der pathomorphologischen Untersuchung mit den anderen getesteten Färbemethoden deutet ebenso auf eine mäßige Qualität der Färbung hin. Mit Sangodiff-G® gefärbte Präparate wiesen den geringsten Anteil morphologisch veränderter Spermien mit 18,31 % und den niedrigsten Gesamtanteil an Samenzellen mit Plasmotropfen von nur 2,08 % (arithmetischer Mittelwert 5,39 %) auf. Darüber hinaus resultiert der auffällig geringe Anteil Kopf- und Kopfkappenveränderungen sicherlich teilweise aus den fleckigen Kopfkappenentfärbungen und Farbpartikelanlagerungen, die die Auswertung deutlich beeinträchtigt haben bzw. die stark betroffenen Samenzellen nicht ausgewertet werden konnten.

Wie bei Oettlé und Soley (1986) beschrieben, stellte sich Spermac® in dieser Untersuchung als schnelle und zuverlässige Methode zur Beurteilung von tierischem Samenzellen dar. Mit Spermac®-gefärbte Proben waren zu allen vier Zeitpunkten uneingeschränkt auswertbar und zeichneten sich im Vergleich zu den anderen getesteten Methoden durch eine gute Farbintensität, gute Schärfe und einen guten Kontrast aus. Nach der Aussage von Schäfer und Holzmann (2000) ist die Färbemethode Spermac® bei feline Samenzellen in erster Linie für die Beurteilung der Akrosomintegrität geeignet und sollte nicht zur Untersuchung von Plasmotropfen verwendet werden. Die herausragende Sensitivität bei der Beurteilung von Akrosomveränderungen konnte mit einem Anteil von 1,14 % im Vergleich zum Mittelwert der anderen Färbemethoden von 0,33 % auch bei der Untersuchung von porcinen Samenzellen gezeigt werden. Es wurden trotz einzelner fleckiger Färbungen von Samenzellköpfen und -kappen (16,67 %) deutlich mehr „nicht vorhandene Akrosome“, „Akrosome in Ablösung“ und „Akrosome mit Vakuolenbildung“ als in den mit anderen

Färbemethoden gefärbten Präparaten erkannt. Der Anteil der Plasmotropfen entspricht entgegen der Feststellung von Schäfer und Holzmann (2000) bei feline Samenzellen mit einem Anteil von 5,28 % annähernd dem Mittelwert aller Färbemethoden von 5,39 %. Bei diesem vergleichend guten Wert sollte allerdings bedacht werden, dass auch bei vielen anderen Methoden bereits der geringe Anteil detektierter Plasmotropfen bemängelt wurde.

Formolcitrat-Bengalrosa wird ebenso wie Spermac® maßgeblich für die Untersuchung des akrosomalen Status von Spermien beispielsweise beim Mensch, Bullen, Ziegenbock, Elefanten und Hirsch verwendet (Nandi et al., 2012; Kitiyanant et al., 2000; Glazier et al., 2000; Gravance et al., 1998; Garde et al., 1997). Die Anwendung beim Eber beschränkte sich bisher auf eine vergleichende Studie zwischen Formaldehyd und Bengalrosa, wobei in dieser Studie bei Bengalrosa-Färbung vermutlich durch die Ausstrichtechnik begründet vermehrt Schwanzbrüche aufgetreten sind (Oberlender et al., 2012). Im Zusammenhang mit der hier durchgeführten Untersuchung wurde allerdings kein Ausstrich, sondern ein aufgetropftes Sperma-Farb-Gemisch mit einem Deckglaspräparat verwendet (Riesenbeck et al., 2001). Dementsprechend kann der erhöhte Anteil Mittel- und Hauptstückbrüche zumindest im Vergleich mit den anderen hier angewendeten Färbemethoden nicht bestätigt werden. Andererseits wurde auf Grund dieser Auftropftechnik ein großer Anteil lanzenförmiger Kopfveränderungen mit 7,97 % bei sofortiger Auswertung beobachtet. Der akrosomale Status lag beim Vergleich der pathomorphologischen Untersuchungen der verschiedenen Färbungen mit einem durchschnittlichen Anteil von 1,5 % sich in Ablösung befindlicher Akrosome im Vergleich mit dem Mittelwert der Färbungen von 2,25 % eventuell durch die einheitliche Pinkfärbung des gesamten Kopfes und Akrosomes im unteren Bereich. Die grundsätzliche Färbequalität zeichnete sich durch die mit Rose Bengal intensiv gefärbten Samenzellen und durch den Verzicht auf eine Hintergrundfärbung deutlichen Kontrast aus. Die Qualität wurde hingegen bei Lagerung des Präparates durch Farbkristallbildung und ein Zusammenziehen des Farb-Samenzell-Gemisches unter dem Deckglas bis hin zur eingeschränkten Auswertbarkeit nach drei Monaten deutlich beeinträchtigt.

Zur Färbung mit Testsimplets® wird auf einen kommerziell hergestellten mit Cresylviolett Acetat und Methylenblau beschichteten Objektträger ein mit einem

Tropfen Sperma benetztes Deckglas aufgebracht. Das entstehende Färbemuster entspricht der im Allgemeinen für Blutausstriche verwendeten Panoptischen Färbung nach Pappenheim. Die Verwendung im Zusammenhang mit porcinen Samenzellen fand erstmalig durch Meissner (1986) statt und kam zu dem Ergebnis, dass Testsimplets® nur bei vorheriger Vorfixierung durch Formolcitrat zur Färbung von Eberspermien geeignet sind. Weder bei nativem Ebersamen, noch bei mit Natriumchloridlösung verdünntem Samen, zeigte sich ein zufriedenstellendes Ergebnis. Auch im Rahmen dieser Untersuchung an flüssigkonservierten Samenzellen wurde die Auswertung sehr stark von den im Hintergrund netzartig aufgespannten Farbresten, unregelmäßig angefärbten Köpfen und die bereits bei Formolcitrat-Bengalrosa bemängelten lanzenförmige Kopflagerung durch verschiedene Flüssigkeitsebenen beeinträchtigt. Darüber hinaus reduziert sich, wie bereits im Zusammenhang mit Sangodiff-G® diskutiert, mit fortschreitender Lagerung durch Entfärbung und Zusammenziehen der Farbtropfen die Auswertbarkeit. Der Vergleich der pathomorphologischen Beurteilungen mit den unterschiedlichen Färbemethoden stellte bei der Färbung mit Testsimplets® den größten Anteil morphologisch veränderter Samenzellen mit 31,81 % dar. Die Ursache findet sich in einem großen Anteil lanzenförmiger Kopflagerung bei der Untersuchung am gleichen Tag mit 3,86 %, auffällig birnenförmigen Kopfveränderungen mit 0,22 %, viele schleifenförmige Hauptstücke mit 10,22 % und den größten Anteil Plasmotropfen mit 12,47 %. Die schleifenförmigen Hauptstücke könnten durch osmotischen Flüssigkeitseinstrom auf Grund der Zusammensetzung des Färbemittels in die Samenzellen entstehen. Die Plasmotropfen haben sich in mit Testsimplets®-gefärbten Präparaten als bräunlich kugelige Gebilde an den Samenzellschwänzen dargestellt und deren eindeutige Identifizierung wurde durch die nahezu im gesamten Präparat vorhandenen netzartigen ebenfalls bräunliche Farbreste erschwert.

Die neunte zum Vergleich stehende Färbung ist ein speziell für Ebersamen zum Verkauf angebotene Zusammenstellung mit dem Farbstoff Methyl-Violett. Bisher sind keine wissenschaftlichen Untersuchungen über diese Färbemethode bei porcinen Spermatozoen zu finden. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass diese Färbung, wenn sie, wie in der Produktanweisung angegeben durchgeführt wird, kein zufriedenstellendes Ergebnis hervorruft. Die

grundsätzliche Qualität der Färbung zeichnete sich durch eine blasse Farbintensität, schlechte Detailerkennbarkeit und schlechten Kontrast aus. Nach langer Wartezeit wird das Samenzellbild auf Grund der offensichtlich zu großen Flüssigkeitsmenge immer noch von einer großen Anzahl übereinander liegender Samenzellen mit lanzenförmigen Kopflagerungen dominiert. Zusätzlich kam es nach einem Tag zu starker Tropfenbildung und dadurch in Schleifen liegenden Samenzellen. Nach einer Woche lagen die Samenzellen in mehreren Ebenen und die Tropfen waren stark zusammengezogen, so dass keine weitere Beurteilung der einzelnen Samenzellen zum Zeitpunkt 3 und 4 erfolgen konnte. Der Grund für dieses mangelhafte Ergebnis liegt eventuell auch in der bereits diskutierten fraglichen Einheit „Tropfen“ und der daraus resultierenden zu großen Flüssigkeitsmenge auf dem Objektträger.

Bei einer qualitativen Betrachtung der Untersuchungsergebnisse nach den Kriterien der Mindestanforderungen an porcine Samenportionen von einem maximalen Anteil von 25 % morphologisch veränderter Samenzellen inklusive Plasmotropfen und einer tolerierbaren Zählabweichung von 5 %, lagen die Ergebnisse bei der färbungsübergreifenden Beurteilung gerade über dem noch zulässigen Grenzbereich. Der Grund für diese hohen Werte morphologisch abweichender Samenzellen ist vermutlich die ausdrückliche Bestellung von qualitativ minderwertigem Sperma bei der Besamungsstation Darmstadt/Griesheim der Zucht- und Besamungsunion Hessen eG, zur besseren Darstellung der Fähigkeiten bzgl. der Analyse pathomorphologischer Veränderungen der einzelnen Färbemethoden.

5.3.4 Vergleich der Lebend-Tot-Beurteilung

Um den Anteil der lebenden bzw. toten Samenzellen in einer Samenportion zu bestimmen, können von den neun zum Vergleich stehenden Färbemethoden nur Eosin und Eosin-Nigrosin verwendet werden. Die Durchführung der beiden Färbungen ist bis auf eine Wartezeit von 30 Sek. nach der Vermischung von Sperma und Färbelösung bei der Färbung mit Eosin-Nigrosin gleich. Beide Färbemethoden besitzen, obwohl der Kopf der toten Samenzellen entsprechend der größeren Farbstoffmenge bei mit Eosin gefärbten Präparaten deutlich dunkler rot angefärbt als bei mit Eosin-Nigrosin gefärbten Präparaten

ist, eine mäßige Farbintensität. Sowohl die Detailerkennbarkeit als auch der Kontrast wurde bei der Färbung mit Eosin-Nigrosin durch die dunkle Hintergrundfarbe Nigrosin besser bewertet als bei der Färbung mit Eosin. Ein weiterer Unterschied ist die Verwendung verschiedener Vergrößerungen bei der Beurteilung des gefärbten Objektträgers unter dem Mikroskop. Durch die Beurteilung von Eosin-Nigrosin in der 1000fachen Vergrößerung mit Öl und dem dunkler gefärbten Hintergrund ist die Unterscheidung der lebenden von den toten Spermien in der Eosin-Nigrosin-Färbung trotz der weniger Rotfärbung einfacher und prägnanter. Um einen besseren Vergleich zwischen den beiden Färbemethoden herstellen zu können, wäre es auch möglich, mit Eosin gefärbte Präparate in der 1000fachen oder mit Eosin-Nigrosin gefärbte Präparate mit der 400fachen Vergrößerung zu beurteilen. Dies ist allerdings in den gängigen Durchführungsprotokollen für Eosin (Busch und Holzmann, 2001; Busch und Waberski, 2007; Hoffmann, 2003) und Eosin-Nigrosin (Dott und Foster, 1972, World Health Organisation, 2010) nicht vorgesehen. Um die Absolutwerte der Vitalitätsbestimmung der beiden Färbemethoden vergleichen zu können, wurde der arithmetische Mittelwert der Differenz zwischen den als vital beurteilten Samenzellen in der Eosin- und in der Eosin-Nigrosin-Färbung bestimmt. Gemessen an dem arithmetischen Mittelwert mit $4,99 \pm 13,94 \%$ und den Median der Differenz von 2, ist der Unterschied zwischen den beiden Färbemethoden sehr deutlich. Die Färbung mit Eosin-Nigrosin zeigt trotz der zusätzlichen Verwendung von Nigrosin als kontrastverstärkende Hintergrundfarbe weniger tote Samenzellen als die Färbung mit Eosin alleine. Es wird allerdings auch weniger Eosinfarbstoff verwendet, was für die Rotfärbung des Kopfes der toten Samenzelle sorgt. Die Spannweite von 83,5 auf Grund der Extremwerte +50 und -33,5 deutet allerdings zusätzlich auf sehr große Schwankungen der einzelnen Werte hin. Zusammenfassend betrachtet, weisen diese Ergebnisse auf große Unterschiede zwischen der Fähigkeit der Beurteilung der Vitalität durch Eosin bzw. Eosin-Nigrosin hin. Dies sollte berücksichtigt werden, wenn diese Färbungen zur Analyse der Vitalität von Samenzellen verwendet werden und daraus Rückschlüsse auf die Qualität des Spermas gezogen werden.

5.3.5 Einfluss der Art der Lagerung des Spermas vor der Färbung auf die Auswertung

Porcine Samenzellen sollten nach der Gewinnung bis zur Besamung bei 15 bis 18°C aufbewahrt werden und sind im Gegensatz zu bovinen Samenzellen sehr empfindlich bezüglich Schwankungen der Lagerungstemperatur. Bei der vorangegangenen Literaturrecherche wurde deutlich, dass die Verwendung von tiefgefrierkonservierten porcinen Samenzellen, welches eine gängige Konservierungsmöglichkeit für bovinen Samen ist, in einer 30 % niedrigeren Abferkelrate und einer Wurfgrößenreduktion von 3 Ferkeln pro Wurf im Gegensatz zur Verwendung von frischem Samen resultiert (Johnson et al. 1981). Die Membranintegrität und dadurch auch die Vitalität der einzelnen Samenzelle werden bei höheren bzw. niedrigeren Temperaturen stark beeinträchtigt (Zou und Yang, 1999). Primär sollte in dieser Arbeit die durch die unterschiedliche Lagerung entstandene Varianz in der Morphologie und Vitalität der Samenzellen für die vielfältigere Einschätzung der getesteten Färbemethoden im Rahmen dieser Untersuchung genutzt werden. Dennoch werden im folgenden Absatz auch die dadurch bemerkten Einflüsse der Lagerungstemperatur auf die Samenzellen beschrieben.

In den Untersuchungen der Pathomorphologie im Rahmen dieser Arbeit konnte der Effekt der extremen, für die Samenzellen eigentlich schädlichen, Temperaturen nicht deutlich heraus gestellt werden. In Tabelle 13 wurden die Lagerungstemperaturen 6°C, 18°C und 38°C über die Färbungen hinweg miteinander verglichen und lediglich die Bewertungspunkte „unregelmäßige Kopfform“, „birnenförmige Kopfform“, „Doppelkopf“, „große/kleines Akrosom“, „aufgerolltes Hauptstück“ und „Plasmotropfen Hauptstück“ weisen auf einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Temperaturen hin. Dies sind alles sehr selten vorkommende Veränderungen (< 5%) und es bestehen im Verhältnis zu diese kleinen Werten große Abweichungen zwischen den unterschiedlichen Temperaturen. Zu vergleichbaren Ergebnissen kommt die Gegenüberstellung der unterschiedlichen Lagerungstemperaturen bei den Färbemethoden Eosin, Eosin-Nigrosin, Diff-Quick®, Hemacolor® und Methyl-Violett (Tabelle 15-19; 23). Allerdings wurden in den beschriebenen Literaturangaben bzgl. der negativen Effekte einer Lagerung des porcinen Samens bei unter 15°C oder über 20°C in der Regel frisches Sperma

verwendet. In dieser Arbeit wurden alle Untersuchungen an weniger empfindlichem flüssigkonserviertem Sperma durchgeführt.

Vereinzelt fielen bei einigen Färbemethoden signifikante Unterschiede der Spermienmorphologie nach den verschiedenen Lagerungstemperaturen auf. Die Färbung mit Sangodiff-G® (Tabelle 19) zeigte insgesamt vermehrt Spermien mit morphologischen Abweichungen bei 38°C (19,25 %) und 6°C (21,67 %) im Verhältnis zu 14 % bei 18°C auf. Diese Abweichungen setzen sich hauptsächlich aus Hauptstückveränderungen und einer gesteigerten Anzahl an Plasmatrophen zusammen. Bei der Färbung mit Spermac® (Tabelle 20) stechen ebenso statistisch relevante Unterschiede der Gesamtzahl der Samenzellen mit morphologischen Abweichungen heraus. Allerdings wurden hier häufiger pathomorphologische Veränderungen bei einer Lagerungstemperatur von 38°C (34,58 %) als bei 6°C (29,17 %) gefunden. Die Färbung mit Formolcitrat-Bengalrosa (Tabelle 21) stellte hingegen deutlich mehr Kopf- und Akrosomveränderung bei der Lagerungstemperatur von 18°C (16,67 %) als bei den Temperaturen 38°C (6,92 %) und 6°C (8 %) heraus. Ebenso wurden bei der Färbung mit Testsimplents® (Tabelle 22) mehr Kopf- und Akrosomveränderungen bei 18°C (5,67 %) als bei 6°C (4,25 %) dargestellt. Insgesamt führen diese sehr stark abweichenden Ergebnisse bei den einzelnen Färbemethoden zu der Schlussfolgerung, dass hier keine einheitliche Aussage über durch unterschiedliche Lagerungstemperaturen hervorgerufenen morphologischen Veränderungen getroffen werden kann.

In vorangehenden Publikationen wird ausgehend von der optimalen Lagerungstemperatur von 15 bis 20°C, eine gleichbleibende Vitalität bei einer Lagerung bei 4°C und eine deutlich sinkende Vitalität bei einer Erhöhung der Lagerungstemperatur auf 40°C beschrieben (Dott und Foster, 1985). Die Untersuchungen zur Vitalität im Rahmen dieser Arbeit (Tabelle 13) bestätigen die gleichbleibende Vitalität bei einer Lagerung bei 6°C und zeigen eine deutliche Verschlechterung bei einer Lagerung bei 38°C. Bei der Färbung mit Eosin bzw. Eosin-Nigrosin von bei 18°C gelagertem Sperma ergab sich einen Mittelwert der Vitalität von 80 % bzw. 87,28 %. Die Ergebnisse bei einer Aufbewahrungstemperatur von 6°C lagen mit einer Vitalität von 84,97 % bzw. 84,36 % dazwischen. Der Mittelwert der Anzahl der lebenden Samenzellen

nahm bei einer Lagerungstemperatur von 38°C auf 70,68 % bzw. 79,27 % ab, was die Empfindlichkeit gegenüber hohen Lagerungstemperaturen bestätigt.

5.3.6 Lagerfähigkeit der gefärbten Objektträger

Aus forensischen Gründen ist es in einigen Fällen notwendig, dass die ausgestrichenen und gefärbten Objektträger nach der initialen Beurteilung aufbewahrt werden, um nach einiger Zeit die dokumentierten Ergebnisse belegen zu können.

Die Beurteilung der Vitalität durch die Auswertung von mit Eosin oder Eosin-Nigrosin-gefärbten Präparaten kennzeichnete sich in den meisten Fällen durch einen Abfall der Anzahl der vitalen Samenzellen bei späteren Untersuchungen. Da bereits bei der ersten Untersuchung alle zu dem Zeitpunkt toten Samenzellen angefärbt werden, lassen sich diese Untersuchungsergebnisse nur durch die nachträgliche Diffusion des Farbstoffes in die Samenzellköpfe erklären.

Die Beurteilung der Pathomorphologie zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten wies ebenso wie bei den unterschiedlichen Lagerungstemperaturen vor dem Färben in den meisten Fällen nur dann statistisch signifikanten Unterschiede auf, wenn die Veränderungen sehr selten sind (< 5 %) und es im Verhältnis zu diesen kleinen Werten große Abweichungen zwischen den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten gibt (Eosin, Eosin-Nigrosin, Diff-Quick®, Spermac®).

Mit Hemacolor® gefärbte Präparate wiesen zusätzlich einen abnehmenden Anteil morphologisch abweichender Samenzellen von 22,56 % auf 18,47 % nach drei Monaten auf. Ebenso auffällig war der abnehmende Anteil Samenzellen mit angelagerten Plasmotropfen von durchschnittlich 2,97 % auf 2,11 %. Der Grund für diese sinkende Wahrnehmung von pathomorphologischen Veränderungen zu späteren Untersuchungszeitpunkten liegt in der sich verschlechternden Qualität der Färbung. Nach drei Monaten stellten sich alle auch direkt nach der Färbung schon als blass bewerteten Präparate noch blasser und zusätzlich mit angelagerten Farbpartikeln dar. Die dadurch beeinträchtigte Detailerkennbarkeit hat zur Folge, dass besonders kleine Veränderungen wie Plasmotropfen nicht zuverlässig erkannt werden.

Aus dem gleichen Grund sank bei der Untersuchung von mit Sangodiff-G®-gefärbten Präparaten der Anteil morphologisch abweichender Samenzellen bei späteren Untersuchungen von anfänglichen 18,31 % mit einem zwischenzeitlichen Anstieg auf 20,5 % nach einer Woche auf 17,63 % nach drei Monaten. Bei der Färbung mit Formolcitrat-Bengalrosa zeigte sich als signifikanter Unterschied direkt nach der Färbung ein mehr als doppelt so großer Anteil Kopf- und Kopfkappenveränderungen mit 10,53 % als nach drei Monaten 4,32 %. Die Ursache liegt in der lanzenförmigen Lagerung der Samenzellen in der Färbelösung zwischen Objektträger und Deckglas und hat keinen Zusammenhang mit der Beschaffenheit der Samenzelle, sondern stellt ein färbungsbedingtes Artefakt dar. Der Anteil der lanzenförmigen Kopfveränderungen liegt beim sofort ausgewerteten Präparat trotz vorgeschriebener Wartezeit bei durchschnittlich 7,97 % und sinkt durch Trocknungsprozesse und dadurch flache Lagerung der Samenzellköpfe auf 0,09 %. Bei mit Testsimplets® gefärbten Samenzellpräparaten war auf Grund der reduzierten Auswertbarkeit durch Entfärbung und zusammengezogene Farbtropfen ab einer Woche nach der Färbung keine Auswertung der statistischen Signifikanz der Abweichungen der Mittelwerte möglich. Es fielen allerdings ebenso wie bei der Färbung mit Sangodiff-G® und Hemacolor® durch Verschlechterung der Färbequalität grundsätzlich reduzierte Anteile morphologisch veränderter Samenzellen bestehend aus Kopf-, Akrosom- und Hauptstückveränderungen zu späteren Untersuchungszeitpunkten auf. Die Färbung mit Methyl-Violett zeichnet sich durch eine nicht mögliche Auswertung ab einer Woche nach der Färbung aus. Aus diesem Grund wurden bei der Berechnung der statistischen Signifikanz nur die beiden ersten Untersuchungszeitpunkte miteinander verglichen. Hier fallen erneut die prägnant hohe Anzahl lanzenförmiger Kopfveränderungen (71,33 %) zum Zeitpunkt 1 auf Grund der großen Flüssigkeitsmenge auf. Zum Zeitpunkt 2 bestimmen schleifenförmige (19,86 %) und geknickte Hauptstückveränderungen (10,61 %) das Samenzellbild. Durch diese deutlich überwiegenden färbungsbedingten Veränderungen an den Samenzellen, lässt sich bei der Färbung mit Methyl-Violett nur noch schwierig ein Rückschluss auf die Qualität der einzelnen Samenzellprobe direkt nach Herstellung ziehen.

5.3.7 Reproduzierbarkeit der Untersuchungsergebnisse bei unterschiedlichen Untersuchungstechniken und Untersuchern

Die Beurteilung der morphologischen Beschaffenheit von Samenzellen ist subjektiv und wird sehr stark von der Erfahrung des Untersuchers beeinflusst (Brazil, 2010; Brito et al. 2011). Das bestätigt sich im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen bereits in den stark abweichenden Ergebnissen, der als morphologisch normal beurteilten Samenzellen der Studenten untereinander und im Vergleich mit dem „Goldstandard“. Zuerst wurde die Anzahl der nicht morphologisch abweichenden Samenzellen aus der studentischen und eigenen Auswertung miteinander verglichen und deren Differenz bestimmt (Tabelle 34 - 37). Diese Differenzwerte waren stark divergierend, so dass die Spannweite der Differenzwerte berechnet wurde (Tabelle 38). Die Spannweite der ausgezählten normalen Spermien desselben Ejakulates und auch der Vergleich zur eigenen Auswertung, zeigten große Schwankungen, die nicht allein durch die eventuell nicht zu vermeidende leichte Heterogenität einzelner Ausstriche zu erklären ist. Der Grund für diese extrem starken Schwankungen liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit neben der Subjektivität des einzelnen Untersuchers in der Unerfahrenheit der ausgewählten Untersucher.

Abschließend konnte keine Beantwortung der eigentlichen Fragestellung erfolgen, weil aufgrund der Rohdaten bereits ersichtlich war, dass die starken Schwankungen der Ergebnisse der Studenten dazu führen, dass keine Rückschlüsse auf die untersuchte Methodik gezogen werden können. Untersuchungen in humanmedizinischen Andrologielaboren haben gezeigt, dass Unterschiede zwischen den einzelnen Untersuchern durch Training und regelmäßige Qualitätskontrollen verbessert werden können (Björndahl et al., 2002; Franken et al., 2003). Um zuverlässigere Daten zur Beantwortung der eigentlichen Fragestellung zu erlangen, sollte dieser Versuch mit vorherigem Training oder Untersuchern mit Erfahrung in der Auswertung von gefärbten porcinen Samenzellausstrichen erfolgen.

5.4 Schlussbetrachtung und Fazit für die Praxis

Ziel der vorliegenden Arbeit war es herauszufinden, welche Färbemethode sich am besten zur lichtmikroskopischen Untersuchung von flüssigkonservierten porcinen Samenzellen eignet. Es wurden neun verschiedene Färbemethoden hinsichtlich der Darstellung der Morphologie und Vitalität der einzelnen Samenzelle, des finanziellen und zeitlichen Aufwandes und der Lagerfähigkeit des angefertigten Ausstriches miteinander verglichen. Es konnten sowohl Vorteile als auch Nachteile der einzelnen Methoden aufgezeigt werden.

Daraus ergab sich, dass die Eosin-Färbung gut verwendet werden kann, weil sie ausreichende qualitative Ergebnisse erzielt. Allerdings sollten bei allen Färbungen (Eosin, Eosin-Nigrosin, Diff-Quick®, Hemacolor®, Sangodiff-G®, Spermac®), die mit Ausstrichen arbeiten, die Ausstrichtechnik berücksichtigt und ein dadurch eventuell erhöhter Anteil einzeln gelagerter Köpfe und Mittelstücke beachtet werden. Eosin-Nigrosin zeichnete sich durch eine deutliche Detailerkennbarkeit aus. Die Färbekits Diff-Quick® und Hemacolor® wiesen ein ähnliches, durchgängig blasses, Färbemuster mit geringer Detailerkennbarkeit auf. Die Färbung mit Sangodiff-G® verfügt über den niedrigsten Anteil durchschnittlich aufgezeigter morphologisch veränderter Samenzellen. Dies deutet darauf hin, dass besonders die körnigen Farbreste die Auswertung grundsätzlich und am meisten die Detailerkennbarkeit erschweren. Mit Spermac® gefärbte Präparate stellten sich, wie bereits in der Literatur beschrieben als herausragend in der Beurteilung des Akrosomes dar. Es konnte bei der Anwendung von Formolcitrat-Bengalrosa zur Färbung porciner Samenzellen die besondere Eignung zur Beurteilung des Akrosomes nicht bestätigt werden. Die Farbqualität und Beurteilung der Morphologie der Samenzellen von mit Testsimplets® gefärbten Präparaten wurde von netzartigen Farbresten und langer lanzenförmiger Kopflagerung eingeschränkt. Die Spermafarbe Methyl-Violett ist zur zuverlässigen Beurteilung von porcinen Samenzellen in der hier gezeigten Durchführung, basierend auf den Produktinformationen, auf Grund der langen Wartezeiten, mäßiger Färbequalität und zahlreichen Artefakten ungeeignet.

Die Beurteilung des zeitlichen Aufwandes zur Herstellung und Auswertung der einzelnen Färbungen zeichnete sich durch eine große Spanne von 59,5 Minuten zwischen der schnellsten Färbung Eosin und der zeitintensivsten Färbung Testsimplets® auf. Ebenso benötigen die Färbungen mit Formolcitrat-Bengalrosa und Methyl-Violett auf Grund langer Wartezeiten ebenso eine lange Gesamtzeit bis zur Auswertung. Darüber hinaus bestehen grundsätzlich zeitliche Unterschiede zwischen Färbungen, die in der 400fachen Vergrößerung schneller (Eosin, Diff-Quick®, Hemacolor®, Sangodiff-G®, Methyl-Violett) als die in der 1000fachen Vergrößerung (Eosin-Nigrosin, Spermac®, Formolcitrat-Bengalrosa, Testsimplets®) ausgewertet werden können.

Der finanzielle Aufwand erstreckt sich über eine Spanne von 1,55 € pro gefärbten Objektträger zwischen der günstigsten Färbung Formolcitrat-Bengalrosa und der teuersten Testsimplets®. Im Wesentlichen sind selbst hergestellte Färbelösungen (Formolcitrat-Bengalrosa, Eosin, Eosin-Nigrosin) bis auf die Ausnahme der Färbung mit Methyl-Violett mit 0,17 € pro gefärbten Objektträger günstiger als kommerziell erhältliche Färbekits (Diff-Quick®, Hemacolor®, Sangodiff-G®, Spermac®, Testsimplets®). Bei zusätzlicher Berücksichtigung der Vergütung der Arbeitszeit sind die zeitintensiven Färbungen (Formolcitrat-Bengalrosa, Testsimplets®, Methyl-Violett) gleichzeitig auch die teuersten Methoden.

Die Lagerung der Samenportionen bei unterschiedlichen Temperaturen vor der Färbung sollte der Steigerung der Varianz der Morphologie und Vitalität der einzelnen Samenzelle dienen, um die Färbemethoden an den unterschiedlichen Ausprägungen vielfältiger beurteilen zu können. Die Vitalität der Samenzellen wurde durch die Lagerung bei höheren Temperaturen im Vergleich zu der empfohlenen Lagerungstemperatur für flüssigkonserviertes porcines Sperma gesenkt. Die Lagerung bei niedrigeren Temperaturen zeigte keinen signifikanten Einfluss. Ebenso hatten die differenten Lagermethoden keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl pathomorphologischer Veränderungen und sind daher nicht dazu geeignet derartige Veränderungen zu induzieren, um die Qualität von Färbemethoden zur Detektion dieser Veränderungen zu überprüfen.

Die Lagerung von gefärbten Ausstrichen hatte verschiedene Einflüsse auf deren Auswertung. Die Anzahl der als lebend zu beurteilenden Samenzellen

der mit Eosin- oder Eosin-Nigrosin gefärbten Präparate reduziert sich bei fortschreitender Lagerung, weil der Farbstoff Eosin nachträglich in die Samenzellen zu diffundieren scheint. Die Färbungen Eosin, Eosin-Nigrosin, Hemacolor®, Diff-Quick® und Spermac® konnten zu allen vier Zeitpunkten beurteilt werden, fielen aber teilweise nach längerer Lagerung auf Grund einer erniedrigten Anzahl morphologisch veränderter Samenzellen wegen verminderter Detailerkennbarkeit auf. Die Färbungen Sangodiff-G® und Formolcitrat-Bengalrosa waren nach einer Woche bzw. drei Monaten zum Teil nicht mehr beurteilbar und mit Testsimplets® gefärbte Präparate konnten bereits am zweiten Tag nicht mehr komplett beurteilt werden. Mit Methyl-Violett gefärbte Präparate sind ab einer Woche nach der Färbung nicht mehr zu bewerten und demnach nicht geeignet zur längeren Lagerung.

6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist der Vergleich verschiedener Färbemethoden von porcinem Sperma für dessen lichtmikroskopische Beurteilung.

Insgesamt handelt sich um die Analyse von flüssigkonservierten Besamungsportionen von 12 verschiedenen Ebern, 36 Präparaten und 144 Auswertungsvorgängen pro Färbemethode. Färbungsübergreifend wurden an insgesamt 324 Präparaten 1296 Auswertungsvorgänge durchgeführt.

Für die untersuchten Färbemethoden konnten folgende relevante Ergebnisse erhoben werden:

Eosin

- Mit Eosin gefärbte Präparate zeichneten sich durch mäßige Farbintensität, gute Detailerkennbarkeit und guten Kontrast aus.
- Abweichend von den durchschnittlichen morphologischen Ergebnissen der Färbemethoden zeigten mit Eosin gefärbte Ausstriche eine gesteigerte Anzahl einzeln gelagerter Köpfe und gebrochener Mittelstücke.
- Mit einer durchschnittlichen Arbeitszeit zur Herstellung und Auswertung eines mit Eosin gefärbten Präparates von 8,17 Min. \pm 23,2 Sek. ist Eosin die schnellste Färbemethode. Bei der zusätzlichen Untersuchung der Vitalität kamen 4,15 Min. \pm 11,65 Sek. dazu.
- Es entstanden Materialkosten von 0,19 € und unter Berücksichtigung der durch die Arbeitszeit entstandenen Personalkosten 1,37 € Gesamtkosten pro gefärbten und ausgewerteten Objektträger.
- Bei der Lagerung von mit Eosin gefärbten Präparaten fielen nur dann statistisch relevante Unterschiede zwischen den einzelnen Untersuchungszeitpunkten auf, wenn die durchschnittlichen Werte sehr niedrig waren ($< 5\%$) und im Verhältnis zu diesen niedrigen Werten große Abweichungen bestanden. Die Auswertbarkeit der gefärbten Ausstriche betrug zu allen vier Zeitpunkten 100 %.

- Eosin ist gut zur Beurteilung der Vitalität geeignet, der Unterschied zwischen lebenden und toten Samenzellen ist deutlich. Die Anzahl der als vital gefärbten Zellen sinkt während der Lagerung der gefärbten Ausstriche.

Eosin-Nigrosin

- Mit Eosin-Nigrosin gefärbte Präparate zeichneten sich durch mäßige Farbintensität, deutliche Detailerkennbarkeit und deutlichen Kontrast aus.
- Abweichend von den durchschnittlichen morphologischen Ergebnissen der Färbemethoden zeigten mit Eosin-Nigrosin gefärbte Ausstriche eine gesteigerte Anzahl Plasmotropfen.
- Die durchschnittliche Arbeitszeit zur Herstellung und Auswertung eines mit Eosin-Nigrosin gefärbten Präparates lag bei 10,37 Min. \pm 22,07 Sek. Bei zusätzlicher Untersuchung der Vitalität kamen 4,97 Min. \pm 7,99 Sek. dazu.
- Es entstanden Materialkosten von 0,20 € und unter Berücksichtigung der durch die Arbeitszeit entstandenen Personalkosten 1,70 € Gesamtkosten pro gefärbten und ausgewerteten Objektträger.
- Bei der Lagerung von mit Eosin-Nigrosin gefärbten Präparaten fielen nur dann statistisch relevante Unterschiede zwischen den einzelnen Untersuchungszeitpunkten auf, wenn die durchschnittlichen Werte sehr niedrig waren ($< 5\%$) und im Verhältnis zu diesen niedrigen Werten große Abweichungen bestanden. Zu späteren Untersuchungszeitpunkten wurde die Auswertung jedoch durch beim Trocknungsvorgang entstandene Farbkristalle und helle Streifen erschwert. Die Auswertbarkeit lag zu allen vier Zeitpunkten bei 100 %.
- Eosin-Nigrosin ist gut zur Beurteilung der Vitalität geeignet, der Unterschied zwischen lebenden und toten Samenzellen ist deutlich. Allerdings zeigten mit Eosin-Nigrosin gefärbte Präparate durchschnittlich $4,99 \pm 13,94\%$ weniger nicht vitale Samenzellen an, als mit Eosin gefärbte Präparate.

Diff-Quick®

- Mit Diff-Quick® gefärbte Präparate zeichneten sich durch blasse Farbintensität, mäßige Detailerkennbarkeit und mäßigen Kontrast aus.
- Abweichend von den durchschnittlichen morphologischen Ergebnissen der Färbemethoden zeigten mit Diff-Quick® gefärbte Ausstriche eine reduzierte Anzahl Kopf- und Akrosomveränderungen, schleifenförmige Hauptstücke und Plasmotropfen. Die Anzahl der Mittelstückveränderungen und geknickten Hauptstücke waren erhöht.
- Die durchschnittliche Arbeitszeit zur Herstellung und Auswertung eines mit Diff-Quick® gefärbten Präparates lag bei 10,76 Min. \pm 20,94 Sek.
- Es entstanden Materialkosten von 1,22 € und unter Berücksichtigung der durch die Arbeitszeit entstandenen Personalkosten 2,77 € Gesamtkosten pro gefärbten und ausgewerteten Objektträger.
- Bei der Lagerung von mit Diff-Quick® gefärbten Präparaten fielen nur dann statistisch relevante Unterschiede zwischen den einzelnen Untersuchungszeitpunkten auf, wenn die durchschnittlichen Werte sehr niedrig waren ($< 5\%$) und im Verhältnis zu diesen niedrigen Werten große Abweichungen bestanden. Drei Monate nach der Färbung fielen entfärbte und teilweise blass gelbliche Bereiche in den Ausstrichen auf, die die Auswertung deutlich erschwert haben. Die Auswertbarkeit der gefärbten Ausstriche betrug trotzdem zu allen vier Zeitpunkten 100 %.

Hemacolor®

- Mit Hemacolor® gefärbte Präparate zeichneten sich durch blasse Farbintensität, mäßige Detailerkennbarkeit und mäßigen Kontrast aus.
- Abweichend von den durchschnittlichen morphologischen Ergebnissen der Färbemethoden zeigten mit Hemacolor® gefärbte Ausstriche eine reduzierte Anzahl Kopf- und Akrosomveränderungen und Plasmotropfen.
- Die durchschnittliche Arbeitszeit zur Herstellung und Auswertung eines mit Hemacolor® gefärbten Präparates lag bei 10,76 Min. \pm 23,95 Sek.
- Es entstanden Materialkosten von 0,46 - 1,36 € und unter Berücksichtigung der durch die Arbeitszeit entstandenen Personalkosten 2,01 – 3,10 € Gesamtkosten pro gefärbten und ausgewerteten Objektträger.

- Bei der Lagerung von mit Hemacolor® gefärbten Präparaten wurde nach drei Monaten auf Grund von Farbverlust und gleichzeitig Farbpartikelanlagerung an einzelne Samenzellen eine deutliche reduzierter Anteil detektierter morphologisch veränderter Samenzellen festgestellt ($p = 0,0273$). Die Auswertbarkeit der gefärbten Ausstriche betrug zu allen vier Zeitpunkten 100 %.

Sangodiff-G®

- Mit Sangodiff-G® gefärbte Präparate zeichneten sich durch blasse Farbintensität, mäßige Detailerkennbarkeit und schlechten Kontrast aus.
- Abweichend von den durchschnittlichen morphologischen Ergebnissen der Färbemethoden zeigten mit Sangodiff-G® gefärbte Ausstriche den niedrigsten Anteil morphologisch veränderter Samenzellen, zusammengesetzt aus einer reduzierte Anzahl Kopf- und Akrosomveränderungen und dem niedrigsten Anteil detektierter Plasmotropfen. Die Auswertung wurde durch das Auftreten von körnigen Farbbrechen im Hintergrund erschwert.
- Die durchschnittliche Arbeitszeit zur Herstellung und Auswertung eines mit Sangodiff-G® gefärbten Präparates lag bei 19,63 Min. \pm 17,98 Sek.
- Es entstanden Materialkosten von 0,83 € und unter Berücksichtigung der durch die Arbeitszeit entstandenen Personalkosten 3,66 € Gesamtkosten pro gefärbten und ausgewerteten Objektträger.
- Bei der Lagerung von mit Sangodiff-G® gefärbten Präparaten kam es zu einem deutlichen Abfall der morphologisch veränderten Samenzellen nach drei Monaten ($p = 0,00229$). Die Auswertbarkeit der gefärbten Ausstriche betrug zum Zeitpunkt 3 nur 91,67 % (33) und zum Zeitpunkt 4 nur noch 55,56 %.

Spermac®

- Mit Spermac® gefärbte Präparate zeichneten sich durch gute Farbintensität, gute Detailerkennbarkeit und guten Kontrast aus.
- Abweichend von den durchschnittlichen morphologischen Ergebnissen der Färbemethoden zeigten mit Spermac® gefärbte Ausstriche einen hohen Anteil morphologisch veränderter Samenzellen,

zusammengesetzt aus zahlreichen detektierten Akrosomveränderungen und vielen gebrochenen Hauptstücken.

- Die durchschnittliche Arbeitszeit zur Herstellung und Auswertung eines mit Spermac® gefärbten Präparates lag bei 19,54 Min. ± 22,25 Sek.
- Es entstanden Materialkosten von 0,90 € pro gefärbten Objektträger und unter Berücksichtigung der durch die Arbeitszeit entstandenen Personalkosten 3,72 € Gesamtkosten pro gefärbten und ausgewerteten Objektträger.
- Bei der Lagerung von mit Spermac® gefärbten Präparaten fielen trotz dem Verblässen der Farbe nur dann statistisch relevante Unterschiede zwischen den einzelnen Untersuchungszeitpunkten auf, wenn die durchschnittlichen Werte sehr niedrig waren (< 5 %) und im Verhältnis zu diesen niedrigen Werten große Abweichungen bestanden. Die Auswertbarkeit der gefärbten Ausstriche betrug zu allen vier Zeitpunkten 100 %.

Formolcitrat-Bengalrosa

- Mit Formolcitrat-Bengalrosa gefärbte Präparate zeichneten sich durch intensive Farbtintensität, deutliche Detailerkennbarkeit und deutlichen Kontrast aus.
- Abweichend von den durchschnittlichen morphologischen Ergebnissen der Färbemethoden zeigten mit Formolcitrat-Bengalrosa gefärbte Ausstriche auf Grund der großen Flüssigkeitsmenge einen hohen Anteil lanzenförmiger Kopfveränderungen bei sofortiger Auswertung und einen niedrigen Anteil gebrochener Mittelstücke.
- Die durchschnittliche Arbeitszeit zur Herstellung und Auswertung eines mit Formolcitrat-Bengalrosa gefärbten Präparates lag bei 51,97 Min. ± 12,32 Sek.
- Mit Materialkosten von 0,15 € ist diese Färbung die günstigste Färbemethode. Unter Berücksichtigung der durch die Arbeitszeit entstandenen Personalkosten entstehen allerdings auf Grund der langen Arbeitszeit 7,68 € Gesamtkosten.
- Bei der Lagerung von mit Formolcitrat-Bengalrosa gefärbten Präparaten ist der Abfall der lanzenförmigen Kopfveränderungen nach einem Tag

Lagerung am deutlichsten ($p < 0,0001$). Nach der Trocknung kam es zur Positionierung der Samenzellen in verschiedenen Ebenen und Farbkristallbildung. Die Auswertbarkeit der gefärbten Ausstriche betrug nach drei Monaten nur 94,44 %.

Testsimplets®

- Mit Testsimplets® gefärbte Präparate zeichneten sich durch gute Farbintensität, gute Detailerkennbarkeit und mäßigen Kontrast aus.
- Es zeigte sich bei mit Testsimplets® gefärbten Ausstrichen der größte Anteil morphologisch abweichender Samenzellen bestehend aus einem hohen Anteil lanzen- und birnenförmiger Kopfveränderungen, schleifenförmiger Hauptstücke und Plasmotropfen. Die Auswertung wurde durch netzartig aufgespannte Farbreste erschwert.
- Die durchschnittliche Arbeitszeit zur Herstellung und Auswertung eines mit Testsimplets® gefärbten Präparates lag bei 67,67 Min. \pm 19,84 Sek.
- Mit Materialkosten von 1,70 € pro gefärbten Objektträger ist diese Färbemethode die teuerste Methode. Unter Berücksichtigung der durch die Arbeitszeit entstandenen Personalkosten entstehen 11,46 € Gesamtkosten.
- Bei der Lagerung von mit Testsimplets® gefärbten Präparaten war der Abfall der lanzenförmigen Kopfveränderungen nach einem Tag Lagerung am deutlichsten ($p < 0,0001$). Nach der Trocknung kam es zur Positionierung der Samenzellen in verschiedenen Ebenen. Die Auswertbarkeit der gefärbten Ausstriche betrug nach einem Tag 97,22 %, nach einer Woche 72,22 % und nach drei Monaten 11,11 %.

Methyl-Violett

- Mit Methyl-Violett gefärbte Präparate zeichneten sich durch blasse Farbintensität, schlechte Detailerkennbarkeit und schlechten Kontrast aus.
- Auf Grund der überwiegend lanzenförmigen Kopfveränderungen (74,86 %) und nicht durchführbaren Auswertung nach einer Woche Lagerung, erfolgte keine weitere vergleichende Untersuchung der Darstellung der morphologischen Beschaffenheit der Samenzellen.

- Die durchschnittliche Arbeitszeit zur Herstellung und Auswertung eines mit Methyl-Violett gefärbten Präparates lag bei 65,44 Min.± 8,55 Sek.
- Es entstanden Materialkosten von 0,17 € und unter Berücksichtigung der durch die Arbeitszeit entstandenen Personalkosten 9,60 € Gesamtkosten pro gefärbten und ausgewerteten Objektträger.
- Bei der Lagerung von mit Methyl-Violett gefärbten Präparaten war der Abfall der lanzenförmigen Kopfveränderungen nach einem Tag Lagerung am deutlichsten ($p < 0,0001$). Zusätzlich kam es zum Anstieg schleifenförmiger Hauptstücke ($p < 0,0001$) und Lagerung in mehreren Ebenen bei der erneuten Untersuchung nach einem Tag. Die gefärbten Präparate konnten nach einer Woche auf Grund von lagerungsbedingten Schäden an den Samenzellen nicht mehr ausgewertet werden.

Zur vielfältigeren Einschätzung der getesteten Färbemethoden sollte die Varianz in der Morphologie und Vitalität der Samenzellen durch die Lagerung vor der Untersuchung bei unterschiedlichen Temperaturen (6 °C, 18 °C, 38 °C) gesteigert werden. Bei dem verwendeten flüssigkonservierten porcinen Sperma konnten keine einheitlichen morphologischen Abweichungen bei den unterschiedlichen Lagerungstemperaturen gezeigt werden. Die Vitalität ist im Bezug zur empfohlenen Lagerungstemperatur von 18 °C bei 4 °C ebenso gleichbleibend. Bei 38 °C Lagerungstemperatur hingegen fällt sie sowohl bei mit Eosin als auch Eosin-Nigrosin gefärbten Präparaten deutlich ab.

Abschließend konnte die Frage nach der Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse bei unterschiedlichen Untersuchern und Untersuchungstechniken auf Grund der stark abweichenden Untersuchungsergebnisse nicht beantwortet werden. Der Grund für diese Schwankungen liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit neben der Subjektivität des einzelnen Untersuchers in der Unerfahrenheit der ausgewählten Untersucher.

7 Summary

The aim of the present study is a comparison of the most common staining methods used for the light microscopic examination of morphology and vitality of boar semen.

For each staining method the liquid preserved semen of 12 boars in 36 smears and 144 evaluation processes was analyzed. Altogether 1296 analyses on 324 smears were carried out for the nine different staining methods.

The following pertinent results could be ascertained for the evaluated staining methods:

Eosin

- Preparations stained with Eosin were characterized by moderate colour intensity, good resolution of detail and good contrast.
- With Eosin stained smears showed deviant from the average morphological results an increased number of single heads without a tail and broken midpieces.
- Eosin was the fastest staining method and took an average time for preparation and evaluation of 8.17 min \pm 23.2 sec. Additionally for the evaluation of vitality another \pm 4.15 min 11.65 sec were needed.
- The price for an Eosin stained smear is 0.19 €. Taken the personnel costs into account the price per stained und examined slide increases to 1.37 €.
- During the storage of Eosin stained slides showed only statistically relevant differences between the moments of investigation, when the average values were very small ($> 5\%$) and the aberration was high in relation to these small values. The interpretability of the stained smears has always been 100 %.
- Eosin is well suited for assessing the vitality, the difference between living and dead sperm is clear. The number of alive detected semen decreases during the storage of the stained slides.

Eosin- Nigrosin

- Preparations stained with Eosin-Nigrosin were characterized by moderate colour intensity, significant resolution of detail and sharp contrast.
- With Eosin-Nigrosin stained smears showed deviant from the average morphological results an increased number of cytoplasmatic droplets.
- The average time for preparation and evaluation took $10.37 \text{ min} \pm 22.07 \text{ sec.}$ Additionally for the evaluation of vitality another $4.97 \text{ min} \pm 7.99 \text{ sec}$ were needed.
- The price for an Eosin-Nigrosin stained smear is 0.20 €. Taken the personnel costs into account the price per stained und examined slide increases to 1.70 €.
- During the storage Eosin-Nigrosin stained slides showed only statistically relevant differences between the moments of investigation, when the average values were very small ($> 5 \%$) and the aberration was high in relation to these small values. At later moments of investigation the evaluation was complicated by colour crystals and bright stripes according to the dehydration of the stain. The interpretability of the stained smears has always been 100 %.
- Eosin-Nigrosin is well suited for assessing the vitality, the difference between living and dead sperm is clear. Indeed with Eosin-Nigrosin stained slides showed a decreased average number of alive detected semen of 4.99 ± 13.94 in comparison to Eosin.

Diff-Quick®

- Preparations stained with Diff-Quick® were characterized by pale colour intensity, moderate resolution of detail and moderate contrast.
- With Diff-Quick® stained smears showed deviant from the average morphological results a decreased number of head and acrosome variations, loop-shaped principal pieces and cytoplasmatic droplets. The number of midpiece variations and buckled principal pieces was increased.
- The average time for preparation and evaluation took $10.76 \text{ min} \pm 20.94 \text{ sec.}$

Summary

- The price for a Diff-Quick® stained smear is 1.22 €. Taken the personnel costs into account the price per stained und examined slide increases to 2.77 €.
- During the storage Diff-Quick® stained slides showed only statistically relevant differences between the moments of investigation, when the average values were very small ($> 5\%$) and the aberration was high in relation to these small values. Three months after staining the smears were decolorized and had partly pale yellowish areas that significantly complicated the analysis. The interpretability of the stained smears has always been 100 %.

Hemacolor®

- Preparations stained with Hemacolor® were characterized by pale colour intensity, moderate resolution of detail and moderate contrast.
- With Hemacolor® stained smears showed deviant from the average morphological results a decreased number of head and acrosome variations and cytoplasmatic droplets.
- The average time for preparation and evaluation took $10.76 \text{ min} \pm 23.95 \text{ sec}$.
- The price for a Hemacolor® stained smear is 0.46 - 1.36 €. Taken the personnel costs into account the price per stained und examined slide increases to 2.01 – 3.10 €.
- During the storage Hemacolor® stained slides showed after three month due to loss of colour and simultaneous adaption of colour particles to the individual sperm cell a significantly reduced proportion of detected morphological variations ($p = 0.0273$). The interpretability of the stained smears has always been 100 %.

Sangodiff-G®

- Preparations stained with Sangodiff-G® were characterized by pale colour intensity, moderate resolution of detail and poor contrast.
- With Sangodiff-G® stained smears showed deviant from the average morphological results the lowest proportion of morphologically altered

sperm cells, composed of a decreased number of head and acrosome variations and the lowest proportion of cytoplasmatic droplets.

- The average time for preparation and evaluation took 19.63 min \pm 17.98 sec.
- The price for a Sangodiff-G® stained smear is 0.83 €. Taken the personnel costs into account the price per stained und examined slide increases to 3.66 €.
- During the storage Sangodiff-G® stained slides showed after three month a significant drop in the morphologically altered sperm ($p = 0.00229$). The interpretability of the stained smear has been 91.67 % after a week and 55.56 % after three months.

Spermac®

- Preparations stained with Spermac® were characterized by good colour intensity, good resolution of detail and good contrast.
- With Spermac® stained smears showed deviant from the average morphological results a high proportion of morphologically altered sperm cells, composed of numerous detected acrosome variations and many broken principal pieces.
- The average time for preparation and evaluation took 19.54 min \pm 22.25 sec.
- The price for a Spermac® stained smear is 0.90 €. Taken the personnel costs into account the price per stained und examined slide increases to 3.72 €.
- During the storage Spermac® stained slides showed after three month despite a significant loss of colour only statistically relevant differences between the moments of investigation, when the average values were very small ($> 5\%$) and the aberration was high in relation to these small values. The interpretability of the stained smears has always been 100 %.

Formolcitrat-Bengalrosa

- Preparations stained with Formolcitrat-Bengalrosa were characterized by intense colour intensity, significant resolution of detail and clear contrast.
- With Formolcitrat-Bengalrosa stained smears showed due to the large amount of liquid a high proportion at immediate evaluation lance-shaped head changes and a low proportion of broken midpieces.
- The average time for preparation and evaluation took 51.97 min \pm 12.32 sec.
- With material costs of 0.15 € per stained slide this staining method is the cheapest method. Taken the personnel costs into account the price per stained und examined slide increases due to a long working time to 7.68 €.
- During the storage Formolcitrat-Bengalrosa stained slides showed a significant drop in the lance-shaped heads after one day ($p < 0.0001$). After drying the sperm cells positioned in a variety of levels and color crystal formations. According to these changes the interpretability of the stained smear has been only 94.44 % after three months.

Testsimplets®

- Preparations stained with Testsimplets® were characterized by good colour intensity, good resolution of detail and moderate contrast.
- With Testsimplet® stained smears showed the largest percentage of morphologically altered sperm cells consisting of a high proportion lance-shaped and pear-shaped heads, loop-shaped principal pieces and cytoplasmatic droplets. The analysis was complicated by meshed colour residues.
- The average time for preparation and evaluation took 67.67 min \pm 19.84 sec.
- With material costs of 1.70 € per stained slide this staining method is the most expensive method. Taking the long working time into account the price increases to 11.46 € total cost.
- During the storage Testsimplets® stained slides showed a significant drop in the lance-shaped heads after one day of storage ($p < 0.0001$).

After drying the sperm cells positioned in a variety of levels. According to these variations the interpretability of the stained smear has been 97.22 % after a day, 72.22 % after a week and only 11.11% after three months.

Methyl-Violet

- Preparations stained with Methyl-Violet were characterized by pale colour intensity, poor resolution of detail and poor contrast.
- Due to the predominantly lance-shaped head changes (74.86 %) and the non-realizable evaluation after one week of storage, there was no further comparative study of the presentation of the morphology of semen cells by this stain.
- The average time for preparation and evaluation took 65.44 min.± 8.55 sec.
- The price for a Methyl-Violet stained smear is 0.17 €. Taken the personnel costs into account the price per stained und examined slide increases to 9.60 €.
- During the storage Methyl-Violet stained slides showed a significant drop in the lance-shaped heads after one day of storage ($p < 0.0001$). In addition, there was a rise of loop-shaped principal pieces ($p < 0.0001$) and the positioning of the sperm cells in multiple layers in the second evaluation after one day. After one week the damage caused on the sperm cells because of the storing made interpretation of morphology impossible.

For the optimal assessment of the different staining methods the variation in morphology of the single sperm cell should have been increased by the storage at different temperatures (6 °C, 18 °C, 38 °C) before staining and evaluation. In this study there could no homogeneous morphological differences in the different storing temperatures be demonstrated, because of the use of liquid preserved porcine semen. The vitality is the same in the recommended storage temperature of 18 °C than at 4 °C. Stored at 38 °C it decreases both with Eosin and Eosin-Nigrosin stained preparations.

Summary

Finally the question of the reproducibility of these results with different investigators and investigation techniques could due to the divergent test results not be answered. The reason for these fluctuations is most probably next to the subjectivity of the individual examiner in the inexperience of the selected examiners.

8 Anhang

Kurzbeschreibung der Pathomorphologie von Eberspermien

1 Kopf- und Kopfkappenveränderungen



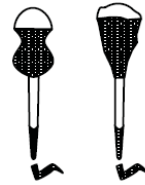
Lanze



birne



rund



amorph



Kappe fehlt/in Ablsg..

2 Mittelstückveränderungen



Halsbruch



asymmetrisch



zu dicker/dünner Ansatz

3 Hauptstück-/Schwanzveränderungen

4 Cytoplasmotropfen



gebrochen



geknickt



gerollt



Schleifen

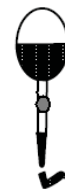


Abbildung 12: Kurzbeschreibung der Pathomorphologie von Eberspermien
(modifiziert nach WHO laboratory manual for examination and
processing of human semen (2010))

Tabelle 5: Formblatt zum Eintragen der Untersuchungsergebnisse bei unterschiedlichen Untersuchungstechniken und Untersuchern

Probennummer:
Name, Semester:

Untersuchungsart: ☐ ungerichtet
☐ mäanderförmig




| Färbemethode | Eosin | Hemacolor | |
|--------------------|-------|-----------|--|
| Normale Spermien | | | |
| Anormale Spermien | | | |
| Kopf und Kopfkappe | | | |
| Mittelstück | | | |
| Hauptstück | | | |
| Plasmatropfen | | | |
| Vitalität | | | |

Anhang

Tabelle 12: Vergleichende Darstellung der Anzahl der als lebend/nicht lebend beurteilten Samenzellen (%) bei den Färbemethoden Eosin und Eosin-Nigrosin und deren Differenz

| | | | Eosin | Eosin-Nigrosin | Differenz |
|---|----|---|-------------|----------------|-----------|
| 1 | ZT | 1 | 89 / 11 | 88 / 12 | 1 |
| | | 2 | 91 / 9 | 91 / 9 | 0 |
| | | 3 | 94 / 6 | 88,5 / 11,5 | 5,5 |
| | | 4 | 90 / 10 | 87 / 13 | 3 |
| | WB | 1 | 71 / 29 | 88,5 / 11,5 | -17,5 |
| | | 2 | 78 / 22 | 80 / 20 | -2 |
| | | 3 | 86 / 14 | 85 / 15 | 1 |
| | | 4 | 90 / 10 | 90,5 / 9,5 | -0,5 |
| | KS | 1 | 61 / 39 | 68 / 32 | -7 |
| | | 2 | 79 / 21 | 80,5 / 19,5 | -1,5 |
| | | 3 | 82 / 18 | 82,5 / 17,5 | -0,5 |
| | | 4 | 88 / 12 | 85 / 15 | 3 |
| 2 | ZT | 1 | 62 / 38 | 75 / 25 | -13 |
| | | 2 | 90 / 10 | 74 / 26 | 16 |
| | | 3 | 82 / 18 | 80 / 20 | 2 |
| | | 4 | 71 / 29 | 70 / 30 | 1 |
| | WB | 1 | 78 / 22 | 78,5 / 21,5 | -0,5 |
| | | 2 | 86 / 14 | 78 / 22 | 8 |
| | | 3 | 61 / 39 | 65 / 35 | -4 |
| | | 4 | 79 / 21 | 80 / 20 | -1 |
| | KS | 1 | 82 / 18 | 78 / 22 | 4 |
| | | 2 | 78 / 22 | 80,5 / 19,5 | -2,5 |
| | | 3 | 76,5 / 23,5 | 79 / 21 | -2,5 |
| | | 4 | 73 / 27 | 79 / 21 | -6 |
| 3 | ZT | 1 | 75 / 25 | 73 / 27 | 2 |
| | | 2 | 91,5 / 8,5 | 88 / 12 | 3,5 |
| | | 3 | 93 / 7 | 86,5 / 13,5 | 6,5 |
| | | 4 | 90 / 10 | 88 / 12 | 2 |
| | WB | 1 | 58 / 42 | 62 / 38 | -4 |
| | | 2 | 60 / 40 | 58,5 / 41,5 | 1,5 |
| | | 3 | 66 / 34 | 70 / 30 | -4 |
| | | 4 | 75 / 25 | 72,5 / 27,5 | 2,5 |
| | KS | 1 | 88 / 12 | 85,5 / 14,5 | 2,5 |
| | | 2 | 87 / 13 | 89,5 / 10,5 | -2,5 |
| | | 3 | 80 / 20 | 80 / 20 | 0 |
| | | 4 | 81 / 19 | 77 / 23 | 4 |
| 4 | ZT | 1 | 96 / 4 | 92 / 8 | 4 |
| | | 2 | 91 / 9 | 91,5 / 8,5 | -0,5 |

Anhang

| | | | | | |
|---|----|---|-------------|-------------|-------|
| | | 3 | 96 / 4 | 90,5 / 9,5 | 5,5 |
| | | 4 | 95 / 5 | 90,5 / 9,5 | 4,5 |
| | WB | 1 | 90,5 / 9,5 | 88 / 12 | 2,5 |
| | | 2 | 86 / 14 | 88,5 / 11,5 | -2,5 |
| | | 3 | 87 / 13 | 87 / 13 | 0 |
| | | 4 | 88 / 12 | 89 / 11 | -1 |
| | KS | 1 | 91 / 9 | 90,5 / 9,5 | 0,5 |
| | | 2 | 93 / 7 | 93 / 7 | 0 |
| | | 3 | 96 / 4 | 92 / 8 | 4 |
| | | 4 | 98 / 2 | 90 / 10 | 8 |
| 5 | ZT | 1 | 68 / 32 | 72,5 / 27,5 | -4,5 |
| | | 2 | 65 / 35 | 69 / 31 | 4 |
| | | 3 | 88 / 12 | 87 / 13 | -1 |
| | | 4 | 80 / 20 | 80,5 / 19,5 | -0,5 |
| | WB | 1 | 65 / 35 | 78 / 22 | -13 |
| | | 2 | 55 / 45 | 72 / 28 | -17 |
| | | 3 | 60 / 40 | 62,5 / 37,5 | -2,5 |
| | | 4 | 40,5 / 59,5 | 38 / 62 | 2,5 |
| | KS | 1 | 87 / 13 | 85 / 15 | 2 |
| | | 2 | 85 / 15 | 82 / 18 | 3 |
| | | 3 | 81 / 19 | 82,5 / 17,5 | -1,5 |
| | | 4 | 78 / 22 | 75,5 / 24,5 | 2,5 |
| 6 | ZT | 1 | 78 / 22 | 88,5 / 11,5 | -10,5 |
| | | 2 | 81,5 / 18,5 | 90 / 10 | -8,5 |
| | | 3 | 76 / 24 | 96 / 4 | -20 |
| | | 4 | 88 / 12 | 78 / 22 | 10 |
| | WB | 1 | 72 / 28 | 87 / 13 | -15 |
| | | 2 | 73 / 27 | 87 / 13 | -14 |
| | | 3 | 69 / 31 | 89 / 11 | -20 |
| | | 4 | 93 / 7 | 70 / 30 | 23 |
| | KS | 1 | 82 / 18 | 93 / 7 | -11 |
| | | 2 | 88 / 12 | 90 / 10 | -2 |
| | | 3 | 92 / 8 | 90 / 10 | 2 |
| | | 4 | 55 / 45 | 50,5 / 49,5 | 4,5 |
| 7 | ZT | 1 | 91 / 9 | 96 / 4 | -5 |
| | | 2 | 90 / 10 | 93,5 / 6,5 | -3,5 |
| | | 3 | 94,5 / 5,5 | 95 / 5 | -0,5 |
| | | 4 | 88 / 12 | 90 / 10 | -2 |
| | WB | 1 | 85,5 / 14,5 | 92 / 8 | -6,5 |
| | | 2 | 90,5 / 9,5 | 90,5 / 9,5 | 0 |
| | | 3 | 88 / 12 | 93 / 7 | -5 |
| | | 4 | 90 / 10 | 91,5 / 8,5 | -1,5 |
| | KS | 1 | 96,5 / 3,5 | 96,5 / 3,5 | 0 |

Anhang

| | | | | | |
|----|----|---|-------------|-------------|-------|
| | | 2 | 90,5 / 9,5 | 92 / 8 | -1,5 |
| | | 3 | 90 / 10 | 93 / 7 | -3 |
| | | 4 | 91 / 9 | 90 / 10 | 1 |
| 8 | ZT | 1 | 92 / 8 | 91 / 9 | 1 |
| | | 2 | 93,5/6,5 | 92 / 8 | 1,5 |
| | | 3 | 94 / 6 | 96,5 / 3,5 | -2,5 |
| | | 4 | 90 / 10 | 92,5 / 7,5 | -2,5 |
| | WB | 1 | 70 / 30 | 48 / 52 | 22 |
| | | 2 | 72 / 28 | 55 / 45 | 18 |
| | | 3 | 85 / 15 | 50,5 / 49,5 | 35,5 |
| | | 4 | 82 / 18 | 45 / 55 | 33 |
| | KS | 1 | 88,5 / 11,5 | 94 / 6 | -5,5 |
| | | 2 | 92 / 8 | 90 / 10 | 2 |
| | | 3 | 90,5/9,5 | 88 / 12 | 2,5 |
| | | 4 | 90 / 10 | 87,5 / 12,5 | 2,5 |
| 9 | ZT | 1 | 78,5 / 21,5 | 80 / 20 | -1,5 |
| | | 2 | 81 / 19 | 83 / 17 | -2 |
| | | 3 | 71 / 29 | 78 / 22 | -7 |
| | | 4 | 68 / 32 | 73,5 / 26,5 | -5,5 |
| | WB | 1 | 65 / 35 | 68 / 32 | -3 |
| | | 2 | 61,5 / 38,5 | 78 / 22 | -16,5 |
| | | 3 | 60 / 40 | 75 / 25 | -15 |
| | | 4 | 67 / 33 | 72 / 28 | -5 |
| | KS | 1 | 86 / 14 | 85 / 15 | 1 |
| | | 2 | 80,5 / 19,5 | 84 / 16 | -3 |
| | | 3 | 82 / 18 | 80 / 20 | 2 |
| | | 4 | 78 / 22 | 70,5 / 29,5 | 7,5 |
| 10 | ZT | 1 | 92,5 / 7,5 | 93 / 7 | -0,5 |
| | | 2 | 71,5 / 28,5 | 94 / 6 | -22,5 |
| | | 3 | 58 / 42 | 92 / 8 | -34 |
| | | 4 | 35 / 65 | 85 / 15 | -50 |
| | WB | 1 | 72 / 28 | 89 / 11 | -17 |
| | | 2 | 70 / 30 | 88 / 12 | -18 |
| | | 3 | 61 / 39 | 86 / 14 | -25 |
| | | 4 | 30 / 70 | 80 / 20 | -50 |
| | KS | 1 | 84 / 16 | 93 / 7 | -9 |
| | | 2 | 90,5/9,5 | 94,5 / 5,5 | -4 |
| | | 3 | 78 / 22 | 94 / 6 | -16 |
| | | 4 | 65 / 35 | 86,5 / 13,5 | -20,5 |
| 11 | ZT | 1 | 82,5/17,5 | 98,5/1,5 | -16 |
| | | 2 | 83,5/16,5 | 96 / 4 | -12,5 |
| | | 3 | 78,5/21,5 | 94 / 6 | -15,5 |
| | | 4 | 75 / 25 | 88,5 / 11,5 | -13,5 |

Anhang

| | | | | | |
|----|----|---|-------------|------------|-------|
| | WB | 1 | 93,5/6,5 | 93,5/6,5 | 0 |
| | | 2 | 80 / 20 | 96,5 / 3,5 | -16,5 |
| | | 3 | 70,5/29,5 | 95,5/4,5 | -25 |
| | | 4 | 65,5 / 34,5 | 92,5 / 7,5 | -27,5 |
| | KS | 1 | 95 / 5 | 95 / 5 | 0 |
| | | 2 | 95,5/4,5 | 93,5 / 6,5 | 2 |
| | | 3 | 95 / 5 | 93 / 7 | 2 |
| | | 4 | 78 / 22 | 90 / 10 | -12 |
| 12 | ZT | 1 | 73 / 27 | 96,5/3,5 | -23,5 |
| | | 2 | 75 / 25 | 92,5 / 7,5 | -17,5 |
| | | 3 | 73 / 27 | 93 / 7 | -20 |
| | | 4 | 70 / 30 | 90 / 10 | -20 |
| | WB | 1 | 38 / 62 | 96 / 4 | -58 |
| | | 2 | 45 / 55 | 91,5 / 8,5 | -46,5 |
| | | 3 | 48,5 / 51,5 | 88 / 12 | -39,5 |
| | | 4 | 35 / 65 | 92 / 8 | -57 |
| | KS | 1 | 93 / 7 | 94,5/5,5 | -1,5 |
| | | 2 | 90 / 10 | 90,5 / 9,5 | -0,5 |
| | | 3 | 91,5 / 8,5 | 88,5/11,5 | 3 |
| | | 4 | 86 / 14 | 91,5 / 8,5 | -5,5 |

9 Literaturverzeichnis

BACH, S.; NEUNDORF, P.; STEMMLER, K. H.; MUDRA, K.; UECKERT, H:
(1982)

Höhe und Bewertung des Anteils anomaler Spermien beim Eber, Mh. Vet.-
Med. 37, 463-467

BAMBA, K. (1988)

Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field
microscopy using an eosin-nigrosin stain, Theriogenology 29, 1245-1251

BJORND AHL, L.; BARRATT, C. L.; FRASER, L. R.; KVIST, U.; MORTIMER, D.
(2002)

Basic semen analysis courses 1995-1999: immediate beneficial effects of
standardized training, Human. Reprod. 17, 1299-1305

BLOM, E. (1950)

A one-minute live-dead sperm stain by means of eosin-nigrosin, Fertil.
Steril. 1, 176-177

BRAZIL, C. (2010)

Practical semen analysis: from A to Z, Asian. J. Andro. 12, 14-20

BRITO, F. C.; GREENE, L. M. KELLERMAN, A.; KNOBBE, M.; TURNER, R.
(2011)

Effect of method and clinician on stallion sperm morphology evaluation,
Theriogenology 76, 745-750

BUSCH, W.; WABERSKI, D. (2007)

Spermatologie

In: BUSCH, W.; WABERSKI, D. (Hrsg.): Künstliche Besamung bei Haus-
und Nutztieren, Schattauer Verlag, 1. Auflage, Kapitel 10, 1-6

- DIDION, B. A.; DOBRINSKI, J. R.; GILES, J. R.; GRAVES C. N. (1989)
Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species, *Gamete Res.* 22, 51-57
- DOTT, H.; FOSTER, G: (1972)
A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential 'life-dead' stain. *J. Reprod. Fertil.* 29, 443–445
- DOTT, H.; FOSTER, G. (1975)
Preservation of differential staining of spermatozoa by formol citrate, *J. Reprod. Fertil.* 45, 57-60
- DREIER, H. K. (2010)
Genitaltrakt
In: W. Kraft, U. Dürr (Hrsg.): *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*, Schattauer, Stuttgart. 6. Aufl., 128
- FRANKEN, D. R.; MENKVELD, R.; KRUGER, T. F.; SEKADDE-KIGONDU, C.; LOMBARD, C. (2003)
Monitoring technologist reading skills in a sperm morphology quality control program, *Fertil. Steril.* 79, 1637-43
- FRENEAU, G. E.; CHENOWETH, P. J.; ELLIS, R.; RUPP, G. (2010)
Sperm morphology of beef bulls evaluation of two different methods, *Anim. Reprod. Sci.* 118, 176-181
- GAGO, C.; PÉREZ-SÁNCHEZ, F.; YEUNG, C. H.; TABLADO, L.; COOPER, T. G.; SOLER, C. (1998)
Standardization of sampling and staining methods for the morphometric evaluation of sperm heads in the *Cynomolgus* monkey (*Macaca fascicularis*) using computer-assisted image analysis, *Int. J. Androl.* 21, 169-176

GARCIA-HERREROS, M.; APARICIO, I. M.; BARON, F. J.; GARCIA-MARIN; L. J.; GIL, M. C. (2006)

Standardization of sample preparation, staining and sampling methods for automated sperm head morphometry analysis of boar spermatozoa, Int. J. Androl. 29, 553-563

GARCIA-HERREROS, M.; BARON, F. J.; APARICIO, I. M.; SANTOS, A. J.; GARCIA-MARIN, L. J.; GIL, M. C. (2007)

Morphometric change in boar spermatozoa induced by cryopreservation, Int. J. Androl. 31, 490-498

GARDE, J. J.; ORTIZ, N.; GARCIA, A.; GALLEGRO, L. (1997)

Use of a triple-stain technique to detect viability and acrosome reaction in deer spermatozoa, Arch. Androl. 39 (1), 1-9

GLAZIER, D. B.; MARMAR, J. L.; DIAMOND, S. M.; GIBBS, M.; CORSON, S. L. (2000)

A modified acrosome induction test, Arch. Androl. 31, 490-498

GRAVENCE, C. G.; VISHWANATH, R.; PITT, C.; GARNER, D. L.; CASEY, P. J. (1998)

Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry, J. Androl. 19 (6), 704-709

HANCOCK, J. L. (1956)

The morphology of boar spermatozoa, J. R. Micr. Soc. 76, 84-97

HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. (1990)

Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa, J. Reprod. Fert. 88, 343-352

- HENKEL, R.; SCHREIBER, G.; STURMHOFEL, A.; HIPLER, U. C.;
ZERMANN, D. H.; MENKVELD, R. (2008)
Comparison of three staining methods for the morphological evaluation of
human spermatozoa, *Fertil. Steril.* 89 (2), 449-455
- HOFFMANN, B. (1993)
Samenbeurteilung
In: HOFFMANN, B. (Hrsg.)
Andrologie, Lehmanns Media Verlag, S. 19-28
- JOHNSON, L. A.; WEITZE, K. F.; FISER, P.; MAXWELL, W. M. C. (2000)
Storage of boar semen, *Anim. Reprod. Sci.* 62, 143-172
- JOHNSON, L. A.; AALBERS, J. G.; WILLEMS, C. M. T.; SYSBESMA, W. (1981)
Use of boar spermatozoa for artificial insemination, I. Fertilizing capacity of
fresh and frozen spermatozoa in sows on 36 farms, *J. Anim. Sci.* 52, 1130–
1136
- KITIYANANT, Y.; SCHMIDT, M. J.; PAVASUTHIPASIT, K. (2000)
Evaluation of sperm acrosome reaction in the Asiatic Elephant,
Theriogenology 53 (4), 887-896
- KOVÁCS, A.; FOOTE, R. H. (1992)
Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa,
Biotech. Histochem. 67 (3), 119-124
- KRUGER, T. F.; ACKERMANN, S. B.; SIMMONS, K. F.; SWANSON, R. J.;
BRUGO, S. S.; ACOSTA, A. A. (1987)
A quick, reliable staining technique for human sperm morphology, *Arch.*
Androl. 18, 275-277
- KUSTRITZ, M.V.R.; OLSON, P.; JOHNSTON, S.D.; ROOT, T.K. (1998)
The effects of stains and investigators on assessment of morphology of
canine spermatozoa, *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 34, 348-352

- KVAC, M.; SAK, B.; HANZLIKOVÁ, D.; KOTILOVÁ, D.; KVETONOVÁ, D. (2009)
Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from Pigs at slaughterhouses in South Bohemia, Czech Republic, *Parasitol. Res.* 104 (2), 425-428
- LASLEY, J. F.; EASLEY, G. T., MCKENZIE, F. F. (1942)
A staining method for the differentiation of live and dead spermatozoa, *Anat. Rec.* 82, 167–174
- LENZ, R. (1976)
Testsimplets – zur einfachen und schnellen Beurteilung der Spermien-Morphologie und Zytologie, Produktinformation von Boehringer Mannheim GmbH
- LI, J.; WANG, S.; ZHU, X. (1999)
Pathological changes following retrograde infusion of methyl violet in the parotid gland of the miniature pig, *Chung Hua Kou Chiang Hsueh Tsa Chih* 94 (2), 91-93
- MAYER, D. T.; SQUIERS, C. D.; BOGART, R.; OLUOFA, M. M. (1951)
The technique for characterizing mammalian spermatozoa as dead or living by differential staining, *J. Anim. Sci.* 10, 226-235
- MEISSNER, G. (1986)
Morphologische Untersuchung von Eberspermien unter Verwendung von Testsimplets, *Reprod. Dom. Anim.* 22 (5), 284-286
- NANDI, P.; GOSH, S.; JANA, K.; SEN, P. C. (2012)
Elucidation of the involvement of p14, a sperm protein during maturation, capacitation and acrosome reaction of caprine spermatozoa, *PLoS ONE* (Electronic Resource) 7 (1), e30552

NEMEJC, K.; SAK, B.; KVENTONOVA, D.; HANZAL, V.; JENIKOVA, M.; KVAC, M. (2012)

The first report of *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium* pig genotype II in Eurasian wild boars (*Sus scrofa*) (Czech Republic), *Vet. Parasitol.*, 184 (2-4), 122-125

OBERLENDER, G.; MURGAS, L. S.; ZANGERONIMO, M. G.; SILVA, A. C.; PEREIRA, L. J.; MUZZ, R. A. L. (2012)

Comparison of two different methods of evaluating boar sperm morphology, *Arch. Med. Vet.* 44, 201-205

OETTLE, E. E. (1986a)

Using a new acrosome stain to evaluate sperm morphology, *Vet. Med.* 81, 263–266

OETTLE, E. E. (1986b)

Changes in acrosome morphology during cooling and freezing of dog semen, *Anim. Reprod. Sci.* 12, 145–150

PAULENZ, H.; GREVLE, I. S.; ANDERSEN BERG, K.; THOMASSEN, R. (1995)

The use of a dichromatic stain method (Spermac®) for determining changes in acrosomal integrity of boar semen during cryopreservation, *Reprod. Dom. Anim.* 30, 113-116

PINTADO, B.; DE LA FEUNTE, J.; ROLDAN, E. R. S (2000)

Permeability of boar and bull spermatozoa to the nuclei acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or to eosin: accuracy in the assessment of cell viability, *J. Reprod. Fertil.* 118, 145-152

RIESENBECK, A.; VÖLGER, D.; HOFFMANN, B. (2001)

Praxisnahe Bestimmung von Vitalitätsparametern zur Beurteilung von Rüdensperma, *Tierärztl. Praxis*; 29, 116-120

RETZIUS, G (1909)

Spermien der Säugetiere, Biologische Untersuchungen, N.F., 14, 165

RODRIGUEZ, L. A.; RIJSSELAERE, T.; BEEK, J.; VYT, P.; VAN SOOM, A.;
MAES, D. (2013)

Boar seminal plasma components and their relation with semen quality,
Systems Biology in Reproductive Medicine, 59(1):5-12

RODRIGUEZ, L.A.; RIJSSELAERE, T.; VYT, P.; VAN SOOM, A.; MAES, D.
(2012)

Effect of dilution temperature on boar semen quality, Reprod. Dom. Anim.
47, 63–66

SCHÄFER, S.; HOLZMANN, A. (2000)

The use of transmigration and SpermacTM stain to evaluate epididymal cat
spermatozoa, Anim. Reprod. Sci. 59, 201-2011

SCHIRREN, C. (1958)

Experimentelle Untersuchungen zur Schnelldifferenzierung menschlicher
Spermatozoen mit Hilfe einer Eosin-Färbung, Arch. Dermatol. Res. 207, 63-
70

SCHIRREN, C. (1977)

Einführung in die Andrologie, Andrologia 9 (4), 348

SCHIRREN, C. (1982)

Motilitätsbestimmung der Spermatozoen, Andrologia 14 (6), 548-550

SOLER, C.; GADEA, B.; SOLER, A. J.; FERNANDEZ-SANTOS, M. R.; ESTESO,
M. C.; NUNEZ, J.; MOREIRA, P. N.; GUTIERREZ, R.; SANCHO, M.; GARDE,
J. J. (2005)

Comparison of three different staining methods for the assessment of
epididymal red deer sperm morphometry by computerized analysis with
ISAS, Theriogenology 64 (5), 1236-1243

STATISTIKSOFTWARE R (1992)

(Free Software Foundation's GNU project, offizielle Homepage)

STEMMLER, K. H.; BACH, S.; NEUNDORF, P.; MUDRA, K.; UECKERT, H.
(1982)

Der Einfluss der Spermienanomalien auf die Befruchtungsleistung beim
Eber, Mh. Vet. Med. 37, 467-470

STEWART, I. (1996)

Die Tränenform, SdW 03, 10

TALBOT, P.; CHACON, R. S. (1982)

A triple-stain technique to evaluate normal acrosome reactions of human
sperm, J. Exp. Zool. 215, 201-208

TAMULI, M. K.; WATSON, P. F (1994)

Use of a simple staining technique to distinguish acrosomal changes in the
live sperm sub-population, Anim. Reprod. Sci. 35, 247-254

THURSTON, L. M.; WATSON, P. F.; HOLT, W. V. (1999)

Sources of variation in the morphological characteristics of sperm
subpopulations assessed objectively by a novel automated sperm
morphology analysis system, J. Reprod. Fertil. 117, 271-280

TSAKMAKIDIS, I. A.; LYMBEROPOULUS, A. G.; KHALIFA, T. A. A (2010)

Relationship between sperm quality traits and field-fertility of porcine
semen, J. Vet. Sci. 11(2), 151-154

VAN DER HORST, G.; MAREE, L. (2009)

SpermBlue®: A new universal stain for human and animal sperm which is
also amenable to automated sperm morphology analysis, Biotech.
Histochem. 84(6), 299-308

WABERSKI, D.; PETRUNKINA, A. M. (2007)

Spermatologie

In BUSCH, W., WABERSKI D. (Hrsg.): Künstliche Besamung bei Haus- und Nutztieren, Schattauer GmbH, Stuttgart, 1. Auflage, 103-106

WEKERLE, L.; SARLÒS, P. (1989)

Vergleich verschiedener Färbemethoden von Eberspermien, Andrologia 21 (5) 449-482

WEITZE, K. F. (2001)

Spermatologische Untersuchung

In: BUSCH, W.; HOLZMANN, A. (Hrsg): Veterinärmedizinische Andrologie –Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren-, Schattauer GmbH, Stuttgart, 1.Auflage, 96

WERNICKE, J. ; SCHIRREN, C. (1982)

Morphologische Differenzierung menschlicher Spermatozoen mittels vorgefertigter Methodik Vergleichende Untersuchungen, Andrologia 14 (6), 471-480

WORLD HEALTH ORGANISATION (2010)

Laboratory manual for the examination and processing of human semen, Part I: Semen analysis, World Health Organisation, Geneva (CH), 5. Aufl., 27, 29, 67-70

XOU, C.-X.; YANG, Z.-M. (1999)

Evaluation on sperm quality of freshly ejaculated boar semen during in vitro storage under different temperatures, Theriogenology 53, 1477-1488

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Annika Schneider

Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herr Prof. Dr. med. vet. Axel Wehrend für die sorgfältige und zeitnahe Betreuung und Beratung in allen Phasen der Arbeit.

Ich danke allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie für Groß- und Kleintiere der Justus-Liebig-Universität Gießen für die gute Zusammenarbeit. Insbesondere spreche ich den Labormitarbeiterinnen für die ständige Unterstützung und schnelle Beschaffung von notwendigen Materialien meinen Dank aus.

Weiterhin gilt mein Dank den Mitarbeitern der Besamungsstation Griesheim der Zucht- und Besamungsunion Hessen e.G. für die bereitwillige Überlassung von zahlreichen porcinen Samenportionen zur gefärbten Untersuchung.

Vielen Dank an Herrn Dr. Failing und Herrn Schaubmar von der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung für ihre Hilfe bei der statistischen Auswertung meiner Datensätze und die ständige Betreuung bei statistischen Fragen.

Meinem Freund Florian danke ich für seine andauernde Geduld mit der einen oder anderen Stimmungsschwankung beim Erstellen dieser Arbeit und seine Unterstützung bei technischen Fragen.

Und nicht zuletzt danke ich meine Eltern, die in jeder Hinsicht den Grundstein für meinen Weg gelegt haben.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6200-2



9 17 8 3 8 3 5 19 6 2 0 0 2 1

